



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE NUEVAS
TECNOLOGÍAS DE
PRODUCCIÓN Y
CONSERVACIÓN DE LA
MICROALGA MARINA
Tisochrysis lutea PARA SU
USO EN ACUICULTURA**

Ángela Cortina Burgueño

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS, TECNOLOGÍA Y GESTIÓN

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



Dña. Ángela Cortina Burgueño

Título de la tesis: **Aplicación de nuevas tecnologías de producción y conservación de la microalga marina *Tisochrysis lutea* para su uso en acuicultura**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso de que el original no esté en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 12 de mayo de 2021

Fdo. Ángela Cortina Burgueño



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Aplicación de nuevas tecnologías de producción y conservación de la microalga marina *Tisochrysis lutea* para su uso en acuicultura

Dña. Ana María Otero Casal

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Ángela Cortina Burgueño, bajo mi dirección, e autorizo su presentación, considerando que reúne os requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para a su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 12 de mayo de 2021

Fdo. Profesora Doctora Ana María Otero Casal



“I follow up the Quest,
despite of Day and Night
And Death and Hell”

Alfred Tennyson (Idylls of the King, 1872)

A mi madre, por preguntarme siempre.

A mi padre, por no preguntarme.

A Gabriel.



AGRADECIMIENTOS

No ha sido fácil, pero he tenido la gran suerte de cruzarme en mi camino con grandes profesionales de los que he aprendido y sigo aprendiendo y cuyo buen hacer, escrúpulos y dedicación me han permitido, no solo realizar este trabajo, sino seguir en este apasionante mundo de las microalgas que, aunque a veces es duro, aporta grandes satisfacciones. Igualmente, soy afortunada por tener a mi lado una gran familia y amigos que me han apoyado, incluso en la distancia, cuando escribía de madrugada en Porto Santo, en asientos de avión de vuelos interminables a Miami y en habitaciones minúsculas de hotel en Londres. A todos, GRACIAS.

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi directora, la Profesora Ana Otero por la paciencia infinita, por ser una fuente inagotable de ideas y conocimiento, por enseñarme a no perder de vista el panorama general sin perder el rigor científico y, especialmente, por no abandonarme.

También quisiera agradecerle al Profesor Gabriel Acién de la Universidad de Almería por permitirme completar mi formación en la Estación Experimental Las Palmerillas y abrirme las puertas a la producción industrial de microalgas.

Á Dra. Martiña Ferreira, por axudarme a dar os meus primeiros pasos no mundo da investigación en microalgas, por ofrecerme outra perspectiva nos momentos de frustración e por animarme a seguir adiante.

A mis compañeros del grupo de investigación, en especial a Sonia, Manu y Pedro S. por los consejos y el apoyo en el día a día.

A Alicia, María del Mar, Rosa, Cintia y Alexia por acogerme en Almería y hacer que mi estancia en Las Palmerillas fuera inolvidable.

To David, Jannet, Niko and the Avespa family, for enabling me to bring my ideas to life and believing in me. And to Carlos, Suzanne and Raffi, for keeping the dream alive closer to home through Algaceuticals and Remediate.

A mis padres. Gracias por vuestra comprensión, paciencia y por mantenerme con los pies en el suelo. Y a mi hermano Arcadio, gracias por hacer que no me olvide de lo que es realmente importante.

A mi familia, “numerosa y beligerante”, por su apoyo incondicional. A los Cortina por ser una piña cuando más se necesita, a los Burgueño por empujarme siempre a dar lo mejor de mí y a Javier y Ana por acogerme desde el primer día.

A mis amigos, que estuvieron a pie de cañón mientras estuve en Santiago y siguieron muy presentes cuando me marché. Bernardo, Mou, Jacky, Paco, Marcos, Jordi, gracias por las Estrellas, los chistes malos, la buena música, los experimentos culinarios y por hacerme sentir arropada, aun estando lejos de casa.

Y a mi marido, Gabriel, gracias por acompañarme en la parte más dura del camino, animándome y poniendo mi bienestar por delante del tuyo, porque nunca me faltó una palabra de ánimo o un café, tanto cuando lo necesité como cuando ni siquiera sabía que lo necesitaba. Sin ti, finalizar no hubiera sido posible.



ABREVIATURAS

ARA: Ácido araquidónico

DHA: Ácido docosahexaenoico

DPA: Ácido docosapentaenoico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FAME: Metil ésteres de ácidos grasos

FDA: Fluoresceín diacetato

GC-MS: Cromatografía de gases y espectrometría de masas

NDIR: Infrarrojos no dispersivos

OHM: Optimum *Heamatococcus* medium

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

RFC: Fuerza centrífuga relativa

TCBS: Agar tiosulfato citrato sales biliares y sacarosa

TSA-1: Agar triptona de soja 1% NaCl

TOC: Carbono orgánico total

TR: Tasa de renovación diaria

UFC: Unidades formadoras de colonias



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	17
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN.....	27
Uso de las microalgas en la acuicultura.....	27
Sistemas actuales de producción masiva de microalgas.....	28
Optimización de parámetros físicos en el sistema de cultivo.....	31
Optimización de los sistemas de cultivo.....	33
Optimización del procesado <i>Downstream</i> para su uso en acuicultura – Separación de la biomasa del medio de cultivo	37
Metodologías de preservación de microalgas.....	40
Producción en acuicultura con microalgas preservadas	41
Producción de <i>T. lutea</i> para acuicultura	42
OBJETIVOS.....	47
MATERIAL Y MÉTODOS	49
Descripción de las especies utilizadas	49
Sistemas de cultivo de microalgas.....	54
Cultivo de rotíferos.....	57
Recuento celular	58
Determinación de la viabilidad celular.....	58
Elaboración de concentrados de microalgas.....	59
Recogida de muestras de microalgas a escala de laboratorio.....	59
Determinación de la concentración de nitrato en el medio de cultivo de microalgas	60
Determinación del carbono orgánico total (TOC).....	60
Determinación de la resistencia celular a la reconstitución de los concentrados	60
Determinación del mantenimiento en la columna de agua.....	60
Determinación del peso seco	61
Análisis elemental (C-H-N).....	61
Determinación del contenido de proteínas	62
Determinación del contenido total de lípidos.....	62
Determinación del contenido de ácidos grasos.....	62
Determinación de bacterias aerobias totales y vibrios.....	63
Tratamiento estadístico.....	63

Capítulo 1 . OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>T. lutea</i>	65
1.1 Estudio del crecimiento de <i>T. lutea</i> e <i>I. galbana</i> en cultivo semicontinuo con distintas temperaturas.	65
INTRODUCCIÓN	65
OBJETIVO	66
DISEÑO EXPERIMENTAL	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
1.2 Optimización del medio de cultivo para <i>T. lutea</i>	83
INTRODUCCIÓN	83
OBJETIVOS	85
DISEÑO EXPERIMENTAL	85
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
1.3 Requerimientos de vitaminas de <i>T. lutea</i> en cultivo semicontinuo	101
INTRODUCCIÓN	101
OBJETIVO	102
DISEÑO EXPERIMENTAL	102
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
Capítulo 2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE BIOMASA Y PRODUCTOS DERIVADOS DE <i>T. lutea</i>	113
2.1 Cultivo industrial de <i>T. lutea</i> e <i>I. galbana</i>	113
INTRODUCCIÓN	113
OBJETIVO	113
DISEÑO EXPERIMENTAL	114
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
2.2 Preparación y Preservación de Concentrados de <i>T. lutea</i> a Escala Industrial	127
INTRODUCCIÓN	127
OBJETIVO	128
DISEÑO EXPERIMENTAL	129
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
Capítulo 3 ELABORACIÓN DE PRODUCTOS BASADOS EN <i>T. lutea</i> PARA SU USO EN ACUICULTURA	141
INTRODUCCIÓN	141
3.1 Elaboración de concentrados de <i>T. lutea</i> en condiciones controladas	142
OBJETIVO	142
DISEÑO EXPERIMENTAL	142
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	142
3.2 Efecto del procesado de <i>T. lutea</i> sobre el crecimiento del rotífero <i>B. plicatilis</i>	155
OBJETIVO	155

DISEÑO EXPERIMENTAL.....	155
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	157
CONCLUSIONES.....	167
BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXO	195
Publicaciones derivadas del trabajo realizado en la presente tesis doctoral.....	197





RESUMEN

Tisochrysis lutea es una microalga marina que se cultiva como alimento de rotíferos, *Artemia* y copépodos, en la cadena trófica de peces, así como para larvas y semilla de bivalvos, por su elevada calidad nutricional. Esta calidad está determinada por un perfil bioquímico, tamaño de partícula y digestibilidad adecuados, ya que cubre los requerimientos de ácidos grasos esenciales poliinsaturados de cadena larga, importantes en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas de peces y bivalvos.

Sin embargo, actualmente para el sector es difícil disponer de un suministro fiable de microalgas de elevada calidad nutricional, no pudiendo abastecerse de acuerdo con las necesidades del criadero y dependiendo de la producción *in situ* que conlleva costes elevados y está expuesta a riesgo de contaminación y variaciones temporales en la composición. *T. lutea*, además, es especialmente sensible y propensa a colapsos probablemente debido a que sus condiciones de cultivo no se han optimizado y/o al requerimiento de un especial control sobre los parámetros de cultivo, que en los sistemas de cultivos de microalgas actualmente implementados en los criaderos no se puede ejercer adecuadamente. Algunos criaderos utilizan productos disponibles en el mercado basados en microalgas y elaborados mediante centrifugación industrial y preservación en frío o liofilizados, para satisfacer las necesidades ante la ausencia de producción *in situ*. Sin embargo, estos productos no terminan de satisfacer a los acuicultores.

Para que se pueda disponer de biomasa de alta calidad de *T. lutea* es, por tanto, necesario estudiar los parámetros nutricionales y ambientales que influyen en el crecimiento y estabilidad de los cultivos, con el objetivo de mejorar la producción *in situ*, además de optimizar la producción industrial de biomasa y productos derivados, que puedan sustituir a dicha producción *in situ*.

Por lo tanto, el presente trabajo se centra en la optimización del cultivo semicontinuo de *T. lutea* mediante la determinación del rango de temperaturas en que se puede cultivar y el análisis de cómo la variación en la temperatura afecta a la composición bioquímica, comparándola con otra microalga similar, *Isochrysis galbana*, que pudiera crecer en otro rango de temperaturas. Se discute también la necesidad de añadir al medio de cultivo determinados micronutrientes y vitaminas, y el uso indiscriminado de las distintas sales de nitrato disponibles, así como la posibilidad de utilizar fertilizantes agrícolas que facilitarían y abaratarían la preparación del medio de cultivo. Los resultados obtenidos tras la optimización a escala de laboratorio se trasladaron a sistemas de cultivo semi-industriales en planta de producción con luz natural, donde se dispone de distintos tipos de sistema de cultivo y las condiciones ambientales, luz y temperatura, varían a lo largo del año, afectando a la productividad de *T. lutea* e *I. galbana* y a su composición bioquímica. En dicha planta de producción también se comparó el efecto de diferentes centrífugas industriales sobre la calidad de la biomasa concentrada de *T. lutea*, analizada desde la perspectiva de su uso como alimento de organismos filtradores en acuicultura. Por último, se estudió el efecto de la cadena de procesado *downstream* de la biomasa de *T. lutea* sobre su calidad, analizando desde el estado nutricional de los cultivos de partida

hasta la preservación a distintas temperaturas y/o liofilizado, pasando por el impacto de la centrifugación. Finalmente se seleccionaron los mejores parámetros de cultivo, centrifugación y preservación para producir productos preservados de *T. lutea* y evaluar su idoneidad como alimento para el cultivo de rotíferos.

De los resultados obtenidos en el estudio comparativo del cultivo semicontinuo de *T. lutea* e *I. galbana* a 15 °C, 22°C, 27°C y 35°C se desprende que ambas presentan rangos de temperatura óptima diferentes, aunque solapantes: *I. galbana* presenta su temperatura óptima a 15 °C y su rango de crecimiento se encuentra entre 15 °C y 27 °C mientras que *T. lutea* presenta su óptimo a 27 °C con un rango de crecimiento entre 22 °C y 27 °C. Ambas especies pueden cultivarse de forma estacional en exteriores para evitar bajas productividades y colapsos de los cultivos, utilizando *I. galbana* en otoño/invierno y *T. lutea* en primavera/verano. Se observa que la luz y la temperatura controlan la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos: La temperatura modifica las densidades de equilibrio, las cuales a su vez hacen variar la luz efectiva por célula favoreciendo la incorporación de carbono. A temperaturas subóptimas disminuye la densidad de equilibrio y se incrementa el peso celular y la síntesis de proteína.

El porcentaje de DHA aumenta con el incremento de la temperatura, pero para el resto de los ácidos grasos parece que la elongación y poliinsaturación están gobernadas por otros factores, además de la temperatura. El porcentaje de ácidos grasos omega-3 es máximo cuando la temperatura es óptima.

En lo tocante a la mejora del medio de cultivo, se concluye que las concentraciones de oligoelementos y vitaminas presentes en el medio Algal son suficientes para sostener cultivos semicontinuos de alta densidad de equilibrio en las condiciones ensayadas. Magnesio, calcio, boro, selenio, y cromo no son elementos necesarios en el medio de cultivo de *T. lutea*.

El fertilizante agrícola disponible en la Estación Experimental Las Palmerillas es adecuado para el cultivo de *T. lutea* sin necesidad de incrementar la concentración de oligoelementos o suplementar con cobalto. Sin embargo, es necesario suplementar el fertilizante con las vitaminas a la misma concentración del medio Algal, lo que podría explicar los fracasos reportados en el cultivo de esta especie con formulaciones industriales. Además, no se observan diferencias entre cultivar con nitrato de sodio de grado analítico o industrial, y el nitrato de calcio y el nitrato de sodio se pueden utilizar indistintamente. Sin embargo, el nitrato de potasio produce peores resultados de crecimiento en la fase de cultivo semicontinuo.

Tras estudiar los requerimientos de las vitaminas comúnmente utilizadas en los medios de cultivo generalistas, B₁ (tiamina), B₇ (biotina o vitamina H) y B₁₂ (cobalamina), se concluye que la adición de vitamina B₁ en el medio de cultivo es imprescindible, ya que sin ella no es posible el cultivo, ni *batch* ni semicontinuo, y no parece ser suministrada por la microbiota acompañante. Por el contrario, no es necesaria la adición de vitamina B₁₂ en un cultivo *batch* porque presumiblemente las bacterias del cultivo exudan suficiente cantidad como para que no sea limitante, incrementándose su requerimiento en la fase de cultivo semicontinuo. Igualmente se determina que la vitamina B₇ no es necesaria para el crecimiento de *T. lutea*.

Como se indicó previamente, también es objeto del presente trabajo comparar las productividades de distintos sistemas de cultivo masivo y de ambas especies en distintas estaciones del año, para determinar si es posible la producción sostenida en el tiempo de

T. lutea. La información disponible hasta el momento indica que la productividad de esta especie es muy variable y con propensión a colapsos, pero los datos son difíciles de comparar debido a que los experimentos se realizaron en ubicaciones diferentes, con sistemas y tasas de cosechado diversos. Por lo tanto, se comparó la productividad de *T. lutea* e *I. galbana* en columna de burbujeo de 100 L y de *T. lutea* en distintos sistemas de cultivo (columna de burbujeo, bolsa cilíndrica, bolsa-panel y fotobiorreactor tubular horizontal) en dos épocas de año (invierno/verano) en las instalaciones de la E. E. Las Palmerilas (Almería, España).

Tanto *T. lutea* como *I. galbana* alcanzan mayores densidades en verano que en invierno, debido a la mayor luz disponible, siendo *T. lutea* más productiva que *I. galbana* en ambos casos ya que la temperatura siempre está dentro de su rango de crecimiento. Sin embargo, las diferencias en invierno se reducen significativamente.

El cultivo semicontinuo de *T. lutea* es posible en exteriores en fotobiorreactor *airlift* tubular horizontal, bolsa cilíndrica, bolsa plana o columna de burbujeo, aplicando una tasa de cosechado diario de 30%, siendo la productividad de los sistemas proporcional a la luz disponible, ya sea por el paso de luz del sistema o la época del año, siempre que la temperatura esté controlada. La bolsa plana es el sistema más productivo, alcanzando $0,29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$.

Una vez establecido un cultivo industrial estable de *T. lutea*, se puede proceder a la producción de concentrados con centrifugas industriales para analizar su calidad en el momento de la elaboración y con el paso del tiempo, refrigerado a 4 °C. Las centrifugas de alimentación continua evaluadas, con caudales de alimentación distintos, someten a distintas fuerzas centrífugas a las células, que afectan a la integridad celular y al crecimiento bacteriano. Del análisis de los resultados se concluye que la bomba de la centrífuga, que determina el caudal de entrada, puede dañar las células, provocando la lisis de hasta el 90% de ellas y un aumento de la concentración de bacterias. El tiempo de residencia de las células en la centrífuga también afecta a la resistencia celular.

Un análisis más detallado, realizado en centrifugas discontinuas de laboratorio, permitió la evaluación del impacto causado en la integridad celular y la calidad tras el cosechado por la fuerza centrífuga, la preservación a distintas temperaturas y la liofilización, así como el estado nutricional de las células de *T. lutea*, modificado mediante la tasa de cosechado del sistema de producción semicontinuo. Se observa que el estado nutricional de las células afecta a la resistencia de éstas al procesado, siendo las células cultivadas con una tasa de renovación del 30% más resistentes que las cultivadas con una tasa de renovación del 10%. Además, el aumento de la fuerza de centrifugación supone un incremento de la lisis celular y la carga bacteriana, disminuyendo la calidad de los concentrados.

Durante la preservación en frío, los ácidos grasos se deterioran sensiblemente y de forma proporcional a su concentración, siendo más acusada la degradación en el concentrado elaborado con biomasa de mayor tasa de renovación. En lo referente a la congelación, un mayor porcentaje de sólidos en el concentrado protege a las células frente a la degradación, que será menos dañina a -80 °C que a -20 °C. La liofilización no produce daño celular más allá del acumulado en los procesos anteriores.

Así, la biomasa de *T. lutea* centrifugada y preservada a 4 °C, produce resultados de crecimiento aceptables, aunque inferiores a aquellos observados con biomasa fresca, en cultivos discontinuos de rotífero con dos raciones diarias.

En resumen, cultivar *T. lutea* atendiendo a su temperatura óptima y requerimientos nutricionales, especialmente de vitaminas, permite obtener cultivos semicontinuos estables de alta densidad, incluso utilizando fertilizantes agrícolas, tanto en sistemas controlados de laboratorio como en los distintos sistemas de cultivo de gran capacidad disponibles. Además, las variaciones en tasa de renovación, luz y temperatura modificarán la composición bioquímica de la biomasa producida, incluyendo los ácidos grasos. El estado nutricional también afectará a la resistencia de las células al procesado *downstream* de la biomasa, cuya optimización pasa por reducir el daño celular provocado por la fuerza centrífuga, el tiempo de centrifugación, el contenido de sólidos de los productos concentrados o la temperatura de congelación. El control de todos estos factores es por lo tanto crucial para el éxito en la utilización de *T. lutea* para cultivar organismos filtradores.







SUMMARY

Tisochrysis lutea is a marine microalgae that is cultured as food for rotifers, *Artemia* and copepods, in the trophic chain of fish, as well as for the larvae and seed of bivalves, due to its high nutritional value. This quality is determined by its biochemical profile, particle size and adequate digestibility, since it covers the requirements of long-chain polyunsaturated essential fatty acids, important for the growth, development and survival of fish and bivalve larvae.

However, it is currently difficult for the sector to have a reliable supply of microalgae with optimal nutritional value, not having access to a steady supply according to the needs of the hatchery and depending on the on-site production, which entails elevated costs and is exposed to contamination risk and seasonal variations of the biochemical composition. *T. lutea*, in addition, is especially sensitive and prone to collapses probably because its culture conditions have not been optimized and/or because it requires a special control over the culture parameters, which in microalgae culture systems currently implemented in the hatcheries cannot be exercised properly. Some hatcheries use microalgae-based products available in the market and elaborated by industrial centrifugation and cold preservation or lyophilization, to meet their needs in the absence of on-site production. However, these products do not fully satisfy fish and shellfish farmers.

In order to ensure the availability of high-quality biomass of *T. lutea* it is necessary to study the nutritional and environmental parameters that influence the growth and stability of the cultures, with the aim of improving on-site production, as well as optimizing the industrial production of biomass and derivative products, which can replace said on-site production.

Therefore, the present work focuses on the optimization of the semicontinuous culture of *T. lutea* by determining the temperature range in which it can be cultured and the analysis of how the variation in temperature affects the biochemical composition, comparing it with its relative *Isochrysis galbana*, which could grow in another temperature range. It is also discussed the need to add certain micronutrients and vitamins to the culture medium and the indiscriminate use of the different nitrate salts available, as well as the possibility of using agricultural fertilizers that would facilitate the preparation of the culture medium and reduce its cost. The results obtained after laboratory-scale optimization were transferred to semi-industrial culture systems in a production plant with natural light, where different types of culture systems are available and environmental conditions, such as light and temperature, vary along the year affecting the productivity of *T. lutea* and *I. galbana* as well as their biochemical composition. In said production plant, the effect of different industrial centrifuges on the quality of the concentrated biomass of *T. lutea* was also compared, analyzing it from the perspective of its use as food for filter feeders in aquaculture. Finally, the effect of the downstream processing chain of *T. lutea* biomass on its quality was studied, analyzing several variables, from the nutritional status of starting cultures and the preservation at different temperatures and / or lyophilization, to the impact of centrifugation. Finally, the best culture, centrifugation and preservation parameters were selected to produce *T. lutea*-based products and evaluate their suitability as food for the cultivation of rotifers.

From the results obtained in the comparative study of the semi-continuous culture of *T. lutea* and *I. galbana* at 15 °C, 22 °C, 27 °C and 35 °C emerges that both have different, although overlapping, optimum temperature ranges: *I. galbana* presents its optimum temperature at 15 °C and its growth range spans between 15 °C and 27 °C while *T. lutea* presents its optimum at 27 °C with a growth range between 22 °C and 27 °C. Both species can be cultured seasonally outdoors to avoid low production and collapses, using *I. galbana* in autumn / winter and *T. lutea* in spring / summer. It is observed that light and temperature control the biochemical composition and fatty acid profile: temperature modifies the equilibrium densities, which in turn make the effective light per cell vary by favoring the incorporation of carbon. At suboptimal temperatures, the steady-state density decreases and the cellular weight and protein synthesis are increased.

The percentage of DHA increases concomitantly with temperature, but for the rest of the fatty acids it seems that elongation and polyunsaturation are governed by other factors, in addition to temperature. The percentage of omega-3 fatty acids is maximum when the temperature is optimal.

Regarding the improvement of the culture medium, it is concluded that the concentrations of trace elements and vitamins present in the Algal medium are sufficient to sustain high-density semicontinuous cultures in the conditions tested. Magnesium, calcium, boron, selenium, and chromium are not necessary elements in the culture medium of *T. lutea*.

The agricultural fertilizer available at the Experimental Station Las Palmerillas is suitable for the culture of *T. lutea* without the need to increase the concentration of trace elements or to supplement with cobalt. However, it is necessary to supplement the fertilizer with vitamins at the same concentration present in the Algal medium, which could explain the failures reported in the cultivation of this species with industrial formulations. In addition, no differences between culturing with analytical or industrial-grade sodium nitrate are observed, and calcium nitrate and sodium nitrate can be used indistinctly. However, potassium nitrate produces worse growth results in the semicontinuous culture phase.

After studying the requirements of the vitamins commonly used in the generalist culture media, B₁ (thiamine), B₇ (biotin or vitamin H) and B₁₂ (cobalamin), it is concluded that the addition of vitamin B₁ to the culture medium is essential since, without it, cultivation is not possible, neither in batch nor semicontinuously, and it does not seem to be supplied by the accompanying microbiota. On the contrary, the addition of vitamin B₁₂ is not necessary in batch culture because presumably the bacteria of the culture exude a sufficient amount so that it is not limiting, increasing its requirement in the semicontinuous culture phase. It is also determined that vitamin B₇ is not necessary for the growth of *T. lutea*.

As previously indicated, it is also the object of this work to compare the productivities of different massive culture systems and both species in different seasons of the year, to determine if it is possible to obtain a steady production of *T. lutea* sustained over time. The information available so far indicates that the productivity of this species is very variable and it shows propensity to collapses, but the data is difficult to compare because the experiments were performed in different locations, using diverse systems and harvesting rates. Therefore, the productivity of *T. lutea* and *I. galbana* was compared in 100-L bubbling columns and of *T. lutea* in different culture systems (bubbling column, cylindrical bag, flat bag and horizontal tubular airlift photobioreactor) in two seasons (winter/summer) at the facilities of the E. S. Las Palmerilas (Almería, Spain).

Both *T. lutea* and *I. galbana* reach greater densities in summer than in winter, due to the increased availability of light, being *T. lutea* more productive than *I. galbana* in both

cases since the temperature is always within its growth range. However, differences in winter are significantly reduced.

The semicontinuous culture of *T. lutea* is possible outdoors on a horizontal tubular airlift, cylindrical bag, flat bag or bubbling column, applying a daily harvest rate of 30%, being the productivity of the systems proportional to the light available, either due to the light path of the system or the time of year, provided that the temperature is controlled. The flat bag is the most productive system, reaching $0.29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$.

Once a stable industrial culture of *T. lutea* is established, the production of concentrates with industrial centrifuges is enabled to analyze their quality at the time of elaboration and through time, refrigerated at 4°C . The continuous-feed centrifuges evaluated, fed with different flows, submit the cells to different centrifugal forces, which affect cellular integrity and bacterial growth. From the analysis of the results, it is concluded that the centrifuge pump, which determines the input flow, can damage the cells, causing the lysis of up to 90% of them and an increase in the concentration of bacteria. The residence time of cells in the centrifuge also affects cellular resistance.

A more detailed analysis, performed in the laboratory with discontinuous centrifuges, allowed the evaluation of the impact caused on its cellular integrity and quality after harvesting by the centrifugal force, the preservation at different temperatures and the lyophilization, as well as the nutritional status of *T. lutea* cells, modified by the harvest rate of the semicontinuous production system. It is observed that the nutritional status of the cells affects the resistance to the processing of said cells, being those cultured with a renewal rate of 30% more resistant than those cultured with a renewal rate of 10%. In addition, an increase in the centrifugal force represents an increase in cell lysis and bacterial load, decreasing the quality of the concentrates.

During cold preservation, fatty acids deteriorate significantly and proportionally to their concentration, being the degradation more pronounced in the concentrate developed with a higher renewal rate biomass. Concerning the freezing, a higher percentage of solids in the concentrate protects cells from degradation, which will be less harmful at -80°C than at -20°C . Lyophilization does not produce cellular damage beyond that accumulated through previous processes.

Thus, the biomass of *T. lutea* centrifuged and preserved at 4°C , produces acceptable growth results, although lower than those observed using fresh biomass, in discontinuous cultures of rotifer with two daily rations.

In summary, the culture of *T. lutea* attending to its optimal temperature and nutritional requirements, especially vitamins, allows stable high-density semicontinuous cultures, even using agricultural fertilizers, both in laboratory-controlled systems and in the different large-capacity culture systems available. In addition to that, variations in renewal rate, light and temperature will modify the biochemical composition of the produced biomass, including fatty acids. The nutritional status will also affect the resistance of the cells to the downstream processing of the biomass, the optimization of which requires the reduction of the cellular damage caused by the centrifugal force, centrifugation time, solids content of the concentrated products or freezing temperature. The control of all these factors is therefore crucial for the success in the use of *T. lutea* to cultivate filter-feeders.



INTRODUCCIÓN

Uso de las microalgas en la acuicultura

Las microalgas desempeñan un papel imprescindible en la acuicultura que, con su despegue en los años 90 en China, supuso en 2018 el 46% de los suministros de pescado frente a la captura, con 114,5 millones de toneladas y 263.600 millones de dólares, casi duplicando la producción desde 2005 (FAO, 2020).

En este mismo informe de la FAO (2020) se subraya que la producción de algas en 2018 ascendió a 32,4 millones de toneladas de las que la mayoría son macroalgas, exponiendo la dificultad de estimar la producción total de microalgas ya que muchos criaderos, que las cultivan de forma rutinaria, y grandes productores como Estados Unidos de América, Australia o Israel no declararon su producción. Se estima que la producción anual de microalgas alcanzó en 2018 las 87.000 toneladas, siendo 86.600 toneladas procedentes de China y casi multiplicándose por 10 las 9.000 toneladas anuales estimadas en 2010 (Brennan & Owende, 2010).

Aunque el uso tradicional de las microalgas se circunscribía a la acuicultura, con cultivos *in situ*, también se ha desarrollado la industria para la producción de compuestos de alto valor añadido como la astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella* sp. y *Spirulina* para alimentación humana, suplementos alimenticios y cosmética, así como otras moléculas bioactivas útiles (Raposo, Maria Filomena de Jesus *et al.*, 2013; Yaakob *et al.*, 2014).

Así mismo, las microalgas se han propuesto como la fuente más eficiente para producir biocombustibles (Harun *et al.*, 2010; Rodolfi *et al.*, 2009), para el tratamiento de aguas residuales (Benemann, 2008; Craggs *et al.*, 2012; Olguín, 2003) y gases de combustión (Hamawand *et al.*, 2014).

En acuicultura, tradicionalmente las microalgas se cultivan como alimento para incluir en la cadena trófica de larvas de peces sirviendo de alimento para rotíferos, *Artemia*, *Daphnia*, copépodos, por su calidad nutricional, que no solo incluye una composición bioquímica adecuada sino también un tamaño de partícula, digestibilidad y ausencia de toxicidad (Webb & Chu, 1983) así como para larvas y semilla de bivalvos, ya que cumplen los requisitos de cantidad de proteína y perfil de aminoácidos, cantidad y perfil de carbohidratos y perfil de ácidos grasos, generalmente en dietas mixtas de microalgas (Knauer & Southgate, 1999). En el caso de los moluscos, estos dependen de las microalgas durante toda su vida, pero generalmente sólo las etapas iniciales en los criaderos se realizan con microalga cultivada, utilizando lo que está naturalmente presente en el agua de mar para alimentar las etapas de engorde.

Las microalgas son excelentes para cubrir los requerimientos de ácidos grasos esenciales poliinsaturados de cadena larga (ARA, EPA, DPA y DHA) en la cadena trófica de peces, como alimento de los rotíferos que serán proporcionados a las larvas por su importancia

en el crecimiento y supervivencia de las larvas (Parrish *et al.*, 2007; Reitan *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1997), desarrollo neuronal, pigmentación, reproducción (Sargent, Bell *et al.*, 1999; Sargent, McEvoy *et al.*, 1999), resistencia al estrés (Montero *et al.*, 2003) e inmunidad (Montero *et al.*, 2004). El DPA ha demostrado ser vital para el cultivo de larvas vieira *Argopecten irradians* (Milke *et al.*, 2006), así como el EPA, el ARA y el DHA son importantes para el mejillón cebrá *Dreissena polymorpha* (Wacker *et al.*, 2002).

En acuicultura de peces y crustáceos la adición de microalgas al cultivo, técnica conocida como aguas verdes, se utiliza para mejorar la calidad del agua, estimular el sistema inmunitario e incrementar el contraste para hacer las presas más aparentes. Es imposible sustituir la microalga por emulsiones o microdietas por lo que, para beneficiarse de esta técnica, es necesaria la mejora de cultivo de microalgas *in situ* o la disponibilidad de un producto con células vivas.

Las microalgas también se han propuesto como ingrediente de las dietas para peces como sustituto a la harina y aceite de pescado, debido a la demanda creciente de proteína con un determinado perfil de aminoácidos y de PUFAs de cadena larga. Como el suministro de ingredientes procedentes del pescado capturado está siendo cada vez menor y más caro, el empleo de otros ingredientes, generalmente de origen vegetal, disminuye la cantidad de PUFAS en el producto final.

El principal problema del sector es disponer de un suministro fiable y poder abastecerse dependiendo de las necesidades del criadero (Duerr *et al.*, 1998). El alto coste asociado con la producción, el riesgo de contaminación y las variaciones temporales en la composición son los factores que dificultan a los acuicultores el empleo de microalgas. Por esta razón, la tendencia es a sustituirlas por dietas formuladas, aunque la eficacia es reducida y algunos ingredientes que se utilizan como fuentes de ácidos grasos omega 3 de cadena larga, como el aceite de pescado, son recursos cuyo precio aumenta anualmente por la escasez de capturas.

Por lo tanto, es necesario mejorar la productividad utilizando parámetros optimizados para las especies de interés y sistemas de cultivo que garanticen estos parámetros, de forma eficiente y segura y con bajos costes de producción, para disminuir el riesgo de carencia de producto, que pondría en peligro la producción de las especies de acuicultura.

Así mismo, la profesionalización e industrialización de la producción de microalgas podría evitar la producción *in situ*, si se consiguiera proveer a demanda y de forma segura, en formatos prácticos con fecha de caducidad elevada, que permitiese que pudieran competir con dietas formuladas.

Sistemas actuales de producción masiva de microalgas

A falta de empresas que produzcan de forma industrial un producto de composición bioquímica controlada para la mayoría de las especies de interés en acuicultura y especialmente para moluscos, los acuicultores cultivan *in situ* en bolsas cilíndricas con luz artificial o natural, muy alejados de las condiciones óptimas de cultivo de las especies productivas (irradiancia, temperatura, salinidad...), obteniendo productividades bajas y frecuentes colapsos. Se ha estimado que la producción *in situ* de microalgas en los criaderos de bivalvos suponen hasta un 30% de los costes de explotación (Coutteau & Sorgeloos, 1992).

Para disminuir los costes de producción en el campo de la acuicultura, es necesario optimizar los sistemas de cultivo *in situ* o profesionalizar el cultivo masivo para producir grandes cantidades de biomasa, con consistencia en la composición bioquímica (homogeneidad entre lotes) y fiabilidad en el suministro. Sin embargo, escalar el cultivo de microalgas a grandes volúmenes para la producción *in situ* de concentrados y pastas no es tarea sencilla ya que supone no sólo un reto de optimización del sistema para maximizar la captación de luz, que es lo que determinará la productividad final del sistema, sino que además requiere enfrentarse a todos los retos de procesado de grandes cantidades de líquido antes, durante y después de la fase de cultivo. Además de optimizar los parámetros de cultivo hay que disponer de sistemas de desinfección del medio de cultivo que eviten la aparición de otras especies competidoras, parásitos y depredadores. Así mismo, tras el cultivo, hay que disponer de un sistema eficiente de separación de los sólidos del medio y capacidad de almacenaje en un ambiente apropiado para incrementar la caducidad de la biomasa.

Medios de cultivo optimizados

El agua de mar natural es en sí un medio complejo, pero, debido a que las concentraciones de nutrientes son bajas, no permite alcanzar elevadas densidades de microalgas. El enriquecimiento con medios concentrados permite obtener productividades mayores.

Medios convencionales como f/2 (Guillard & Ryther, 1962), Conwy (Walne, 1970) o Algal (Fábregas *et al.*, 1984) están diseñados para poder utilizarse con un amplio número de especies marinas, aportando nitrógeno, fósforo, hierro, diversos oligoelementos y vitaminas, presentando diferentes ratios entre los componentes. Esta versatilidad es una ventaja cuando se trabaja con muchas especies, ya que simplifica la elaboración de medios de cultivo. Sin embargo, al no atender a los requerimientos específicos de cada microalga, no se puede maximizar su productividad a nivel específico.

Las funciones de los componentes del medio de cultivo determinan la concentración necesaria:

Fuentes de nitrógeno. Las microalgas pueden utilizar de forma directa e incorporándolo por difusión pasiva el ion amonio NH_4^+ , así como por transporte activo transmembrana los iones nitrato NO_3^- y nitrito NO_2^- . Así mismo, puede utilizar fuentes orgánicas como la urea. La preferencia de consumo de una fuente u otra parece estar ligada a la especie (Lourenço *et al.*, 2002). El empleo de sales de amonio está desaconsejado ya que su consumo produce un aumento brusco del pH en el medio (más difícil de controlar que cuando se utiliza nitrato o nitrito) que además produce la formación de amoníaco, que puede resultar tóxico.

Fuentes de fósforo. Generalmente se utilizan sales inorgánicas solas o combinadas. La ratio de N:P varía dependiendo del medio de cultivo (16:1 para el medio f/2, 20:1 para el Algal y 9,83:1 para el Conwy). Ratios mayores que Redfield (16:1) parecen ser limitantes en fósforo (Berges *et al.*, 2001).

Oligoelementos y elementos traza. Generalmente los metales y metaloides están en forma catiónica en el mar. Estos elementos, que participan generalmente como cofactores de enzimas en una gran variedad de rutas metabólicas, son requeridos en un estrecho intervalo de concentración, que si no se satisface los convierte en limitantes y si se sobrepasa, produce toxicidad. La toxicidad normalmente ocurre por la incorporación de otros metales e interferencia metabólica (Andersen, 2005).

El hierro es elemento más importante y generalmente es el limitante en el medio natural. Participa en el transporte de electrones fotosintético y en el respiratorio, en la reducción de nitratos y nitritos y en la detoxificación de radicales superóxido y H_2O_2 .

Otros elementos necesarios para la detoxificación son el manganeso y el selenio. El manganeso participa en los centros fotosintéticos de oxidación del H_2O y en la enzima superóxido dismutasa (SOD) mientras que el selenio es cofactor de la glutatión peroxidasa.

El zinc forma parte de la anhidrasa carbónica, enzima necesaria para la fijación de CO_2 , por lo que sus requerimientos aumentan con el descenso de la concentración de CO_2 . También está presente en proteínas con motivos estructurales de dedos de zinc, que suelen participar en la transcripción de ADN y como cofactor de la fosfatasa alcalina.

Igualmente imprescindible para la realización de la fotosíntesis, el cobre es necesario en la citocromo oxidasa de la cadena transportadora de electrones y en la plastocianina.

Para los medios preparados con agua de mar, el requerimiento de cobalto es pequeño y generalmente está asociado a la síntesis de vitamina B_{12} en aquellas especies que la sintetizan *de novo*. Además, no suele ser necesario adicionar molibdeno o níquel, ya que no son limitantes en el medio marino. El molibdeno participa en el funcionamiento de la nitrato reductasa y se encuentra en forma de anión MoO_4^{2-} en el agua de mar. Al ser un oxianión, no se puede quelar con EDTA. El níquel es necesario para el funcionamiento de la ureasa.

Magnesio, calcio y boro están presentes en cantidades suficientes en el agua de mar por lo que no es necesario añadirlos al medio de cultivo cuando se utiliza agua de mar natural.

Vitaminas. Las vitaminas, que se añaden de forma rutinaria e indiscriminada a los medios de cultivo, además de encarecerlos sensiblemente, complican su preparación y la recirculación del medio de cultivo al ser sensibles a la mayoría de los métodos de desinfección.

Aunque están presentes en todos los medios de cultivo, los requerimientos entre especies, incluso del mismo género, varían inexplicablemente sin patrón evolutivo. Provasoli & Carlucci (1974) revisaron los requerimientos de 306 especies microalgales y encontraron que más de la mitad necesitan B_{12} , el 22% necesitan B_1 y sólo el 5% requieren biotina. El resto de las vitaminas parecen ser sintetizadas sin problemas o no ser necesitadas.

Poco se sabe sobre las rutas de biosíntesis de vitaminas en aquellas microalgas capaces de sintetizarlas y menos aún sobre su papel en el metabolismo. Sin embargo, la decisión de retirar una vitamina del medio de cultivo cuando no es necesaria para el crecimiento de la microalga puede repercutir en la calidad de la biomasa producida, ya que las microalgas pueden no requerir una vitamina, pero sí incorporarla y ésta pasar a estratos superiores de la red trófica a través del zooplankton, como ya describieron Watanabe *et al.* (1983) y Brown *et al.* (1999).

La tiamina o vitamina B_1 , 2-[3-[(4-amino-2-metil-pirimidina-5-il)metil]-4-metil-tiazol-5-il], es una vitamina hidrosoluble cuyo papel en el metabolismo de microalgas no está estudiado pero, al ser cofactor de reacciones enzimáticas en rutas metabólicas muy generales en plantas, se asume que su papel pueda ser similar.

La cobalamina o vitamina B₁₂, es un tetrapirrol de cobalto sintetizado por las todas las Archaea y muchas Eubacteria, que lo usan como cofactor de enzimas implicadas en la transferencia de grupos metilo, por ejemplo, en la síntesis de metionina. Sólo se han encontrado enzimas para la síntesis de B₁₂ en procariotas.

La biotina, compuesta por un anillo ureido fusionado con un anillo tetrahidrotiofeno, que en la mayoría de los organismos participa en la síntesis y degradación de glúcidos, lípidos y aminoácidos, parece no ser necesaria para el cultivo de la mayoría de las microalgas, bien porque sean capaces de sintetizarla o bien porque ninguna enzima la necesite como cofactor. Sin embargo, añadir la biotina al medio de cultivo no tiene efectos deletéreos sobre las microalgas (Provasoli & Carlucci, 1974).

Fuentes industriales de nutrientes. Fertilizantes agrícolas. En paralelo a optimizar los medios de cultivo eliminando los elementos innecesarios y optimizando las ratios de consumo, otra forma de disminuir los costes de producción de microalgas es sustituir los químicos empleados para preparar los medios por fertilizantes agrícolas.

Los fertilizantes agrícolas se han empleado con éxito en el cultivo discontinuo de *Dunaliella salina* (Barakoni *et al.*, 2015), *Nannochloropsis salina* (Liu & Bangert, 2014), *Chaetoceros gracilis* (López Ruiz *et al.*, 1995), *Chaetoceros muelleri* (Martínez-Cordova *et al.*, 2012; Pacheco-Vega & Sanchez-Saavedra, 2009), diatomeas del género *Nitzschia* (Simental & Sanchez-Saavedra, 2003), *Tisochrysis lutea* (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999), *Rhodomonas* sp. (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005) y cultivo continuo de *N. gaditana* (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2013).

Optimización de parámetros físicos en el sistema de cultivo

A la hora de diseñar los sistemas de cultivo se deben mantener los parámetros dentro de los valores que permitan maximizar la productividad:

Luz incidente, orientación y relación superficie/volumen

La luz recibida por célula dependerá de la irradiancia (potencia por unidad de superficie), número de horas de luz, del paso de luz, la concentración de biomasa, que produce sombreado mutuo, y la turbulencia que proporciona los ciclos de luz/oscuridad (Grobelaar, 2009). Los ciclos luz/oscuridad durante la fase luminosa han de ser lo más cortos posibles. En columnas pueden ser menores de 2 s. Sin embargo, en reactores tubulares son mayores de 10 s (Janssen *et al.*, 2003).

Gases disueltos y transferencia de masa

Oxígeno: Concentraciones iguales o superiores a 0,225 mM a 20°C pueden inhibir la fotosíntesis, aunque la concentración de CO₂ sea alta (Aiba, 1982). Además, cuando la radiación incidente es elevada, la producción de oxígeno puede ser igualmente alta y alcanzar concentraciones tóxicas por reducción de la tasa fotosintética y fotooxidación si la turbulencia no es adecuada y no se elimina del sistema de cultivo apropiadamente (Richmond, 1990).

CO₂: Nutriente necesario para realizar la fotosíntesis, es necesario mantener la concentración para que no sea un nutriente limitante. Se ha propuesto que una concentración de 0,076 mM en condiciones de saturación por luz puede cubrir los requerimientos (Doucha *et al.*, 2005) pero dependerá de la concentración de biomasa y la tasa de crecimiento.

pH: Generalmente para mantener el pH en los cultivos, a la par que para mantener la concentración de CO₂, éste se inyecta a intervalos regulares o a demanda con sondas que activan electroválvulas dosificadoras. Generalmente un pH entre 7 y 8 mantiene la mayor concentración de CO₂ disuelto.

Agitación: Necesaria para incrementar la transferencia de masa, reducir los gradientes de nutrientes y evitar la sedimentación, proporciona a las células la exposición suficiente a la luz y oscuridad. Dependiendo del tipo de sistema se puede realizar con aireación o palas mecánicas.

Efecto cizalla: Es un tipo de estrés hidrodinámico causado por el uso de sistemas de aireación con burbujas demasiado pequeñas, la velocidad de rotación de las palas empleadas para mezclar o de bombas de impulsión que son imprescindibles para el cultivo, pero pueden producir daños especialmente en células que carezcan de pared (Wang & Lan, 2018).

Temperatura

Es un parámetro crucial que determina la tasa de crecimiento de las microalgas y por lo tanto ha de ser controlado en los sistemas de cultivo. Cuanto mayor es el volumen y la exposición a la luz, más necesario se hace disipar el calor. Las estrategias comunes para controlar la temperatura son regular la temperatura ambiental confinando los sistemas de cultivo, intercambiadores de calor dentro de los cultivos o utilizar aire enfriado para la mezcla.

La temperatura óptima de crecimiento de las microalgas en las que son capaces de realizar la fotosíntesis, la división celular y otros procesos fisiológicos, puede delimitarse en un intervalo más o menos amplio, variando entre los distintos grupos e incluso entre especies del mismo género y cepas de la misma especie (Kräbs & Büchel, 2011). De esta forma, se pueden encontrar microalgas en las regiones más frías del planeta, donde tienen que sobrevivir a temperaturas cercanas al punto de congelación como *Chlamydomonas subcaudata* (Morgan-Kiss *et al.*, 2002) y *Chlamydomonas nivalis* (Lukeš *et al.*, 2014), así como en ambientes con temperaturas en torno a los 40°C como *Chlorella sorokiniana* (Cuaresma Franco *et al.*, 2012).

Las variaciones en la temperatura desencadenan mecanismos de adaptación celular para poder realizar los procesos vitales de forma efectiva, ejerciendo un impacto en la tasa de crecimiento y composición bioquímica. Sin embargo, se han observado diferentes respuestas o mecanismos de adaptación dependiendo de la especie de microalga:

En lo referente a la incorporación de sustancias para la nutrición, la temperatura afecta variando la solubilidad de los distintos nutrientes y gases presentes en el medio de cultivo y modificando la difusión transmembrana, debido al impacto de la temperatura en la viscosidad de ésta. Además, temperaturas por debajo o por encima del óptimo afectan a la cinética de las enzimas responsables del transporte activo de nutrientes como el NO₃⁻, PO₄³⁻ y en algunos casos HCO₃⁻, aunque el efecto es mayor sobre procesos químicos no catalizados (Raven & Geider, 1988).

Además, al afectar a la eficiencia fotosintética y a la velocidad de reacción de las enzimas que catalizan reacciones químicas en las células, no sólo se ve afectada la capacidad de obtención de nutrientes del medio sino también la síntesis bioquímica (aminoácidos, pigmentos protectores, ácidos grasos...) y la habilidad de producir y almacenar

carbohidratos, que a su vez tiene impacto sobre la producción y movilización de lípidos (Hancke *et al.*, 2008) .

Las variaciones en temperatura modifican el perfil de aminoácidos en *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp. (James *et al.*, 1989), la producción de exopolisacárido en *I. galbana* y *T. lutea* (Claquin *et al.*, 2008), el contenido en ceniza en varias especies tropicales, incluida *T. lutea* (Renaud *et al.*, 2002) y la síntesis de β -caroteno en *D. salina* (Orset & Young, 1999). *D. salina* y *D. tertiolecta*, capaces como otras microalgas de modificar la concentración de clorofila, por ajuste del fotosistema II, dependiendo de la intensidad luminosa, ven comprometida esta capacidad de ajuste en temperaturas subóptimas, induciéndose la acumulación de carotenoides en intensidades luminosas no fotoinhibitorias a temperaturas óptimas (Kró *et al.*, 1997; Levasseur *et al.*, 1990). *C. nivalis*, capaz de crecer en un rango de temperatura amplio entre 2,5°C y 35°C y tasas máximas de crecimiento entre los 10 y los 30°C, responde a las variaciones ambientales de temperatura modificando en sus membranas tilacoidales las proporciones de los tipos de fosfolípidos, presentando máximas concentraciones de fosfatidilglicerol (hasta un 80% del total) en las temperaturas extremas, 5, 30 y 35°C, donde la tasa de crecimiento es mínima.

El efecto de la temperatura sobre el perfil de ácidos grasos también ha sido objeto de estudio, pero, debido a que este perfil también se ve influenciado por la fase de crecimiento y la disponibilidad de luz por célula, aislar el efecto de cada variable es complicado. Varios autores atribuyen un incremento en la ratio de ácidos grasos insaturados frente a los saturados para mantener la fluidez de las membranas con el descenso en la temperatura (Ackman *et al.*, 1968; Kró *et al.*, 1997; Levasseur *et al.*, 1990; Mortensen *et al.*, 1988; Raven & Geider, 1988; Renaud *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 1995; Thompson, Guo, Harrison & Whyte, 1992; Xin *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha encontrado que algunas microalgas responden a las variaciones de temperatura de manera diferente, no existiendo una relación consistente entre descenso de temperatura e insaturación de los ácidos grasos (James *et al.*, 1989; Renaud *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1992).

Optimización de los sistemas de cultivo

Sobre el diseño de sistemas de cultivo para obtener la mayor productividad controlando la inversión y los costes de operación, el debate continúa entre el empleo de sistemas cerrados o abiertos. Ambos tipos de sistemas presentan ventajas e inconvenientes y producen diferentes resultados a la hora de cultivar microalgas. Aunque los sistemas abiertos requieren una menor inversión, no son aceptables para el cultivo de microalgas destinadas a la producción de moléculas de alto valor añadido o especies de interés para acuicultura, por lo que su uso está limitado a especies que crecen en condiciones extremas de temperatura, salinidad y/o pH, (*Dunaliella* sp., *Spirulina* sp., fase de estrés de *Haematococcus pluvialis*) o con elevadas tasas de crecimiento, que limitan el desarrollo de contaminantes (Borowitzka, 1999). Por ello, dependiendo del espacio disponible, el objetivo del cultivo (sumidero de CO₂, tratamiento de aguas residuales, producción de biomasa para alimentación animal o nutracéuticos...), la calidad de biomasa requerida, la dependencia del clima o la necesidad de estandarización, se determinará la elección del sistema de cultivo más apropiado (Acién Fernández, Fernández *et al.*, 2012; Borowitzka, 1999; Grobbelaar, 2009; Pulz, 2001; Pulz & Gross, 2004; Yadala & Cremaschi, 2014; Zijffers *et al.*, 2010).

Sistemas abiertos. De todos los sistemas, son los que requieren la menor inversión en materiales por m², pero requieren una gran cantidad de terreno. La baja productividad de estos sistemas se debe al bajo control sobre los parámetros de cultivo como la evaporación, baja penetración de la luz y baja relación superficie/volumen, facilidad de contaminación e incremento de temperatura. Una solución intermedia ha sido la construcción dentro de invernaderos. En estos sistemas, la baja productividad incrementa el coste en la fase de procesado al tener que manejar volúmenes altos.

Dentro de los sistemas abiertos podemos destacar los estanques abiertos, los sistemas *raceway* y los de capa fina o *thin-layer*.

“Open pond”: No considerado como fotobiorreactor, consiste en un estanque donde el único control se ejerce sobre la fertilización.

“Raceway”: Sistema más sofisticado que el *open pond*, donde se controla la profundidad y el movimiento del cultivo. Aunque no requiere una gran inversión, ni tiene elevados costes de operación ni energéticos, presenta poca eficiencia de aprovechamiento de la luz, baja transferencia de masa y ningún control sobre la temperatura por lo que no permite alcanzar grandes concentraciones, en torno a 0,6 g·L⁻¹ (Pulz, 2001; Tredici, 2004), llevando a productividades bajas de 0,05 g·L⁻¹·día⁻¹. Además, al ser un sistema abierto, la probabilidad de contaminación es mayor, así como la evaporación. Sin embargo, es el sistema más utilizado por su precio y posibilidad de escalado. Para incrementar la disponibilidad de CO₂, se ha realizado una modificación del “raceway” tradicional añadiendo un sumidero o columna de mezcla, donde se inyecta CO₂ y se ventila el O₂ antes de devolver el cultivo a la zona expuesta a la luz (Acién Fernández, González-López *et al.*, 2012).

“Thin-Layer”: Diseñado como modificación del *raceway*, presenta un sumidero donde se realiza la inyección de CO₂ y una bomba que impulsa el cultivo hacia una superficie plana donde se genera una fina capa de cultivo que está expuesta a la luz, incrementándose la relación superficie/volumen para maximizar la captación. Se ha documentado que estos sistemas pueden alcanzar una productividad de hasta 3 g·L⁻¹·día⁻¹ en cultivo *fed-batch* (Doucha *et al.*, 2005).

Sistemas cerrados. En estos sistemas que mantienen el cultivo confinado, aislado del ambiente, generalmente se ejerce control sobre los parámetros físicos como temperatura y volumen de cultivo expuesto a la luz, así como el medio de cultivo. Pueden utilizar luz artificial, natural o una combinación de ambas, expuestos a la luz directa, resguardados en invernaderos o en el interior de instalaciones de cultivo diseñadas para tal efecto.

Más o menos sofisticados, los costes de construcción son variables, pero más altos que los sistemas abiertos. Sin embargo, al poderse escalar en altura, es posible incrementar el ratio volumen/superficie, incrementando la productividad por m² y no necesitando tanto terreno como los sistemas abiertos. Los costes de operación son variables dependiendo del sistema. Además, permiten un control mayor sobre los parámetros de cultivo por lo que se alcanzan mayores productividades. Al ser sistemas cerrados se ven menos afectados por contaminaciones, evaporación o precipitación (Acién Fernández *et al.*, 2012).

Entre los sistemas cerrados podemos encontrar las bolsas cilíndricas, las columnas de burbujeo, los paneles o los fotobiorreactores tubulares.

Bolsas cilíndricas: Este es el sistema de producción más común en las instalaciones de acuicultura. De volumen variable pero inferior a 1000 L. generalmente cuentan con iluminación baja, con aireación, pero sin adición de CO₂ y son operados en régimen discontinuo, por lo que la productividad es muy baja, en torno a 0,12 g·L⁻¹ (Müller-Feuga, 2000).

Columnas de burbujeo: Utilizadas comúnmente en la industria no como sistemas de cultivo *per se*, sino como sistemas de producción de inóculo para los fotobiorreactores, pueden alcanzar productividades mayores que las bolsas cilíndricas, por lo que se plantean como una alternativa a éstas en las instalaciones de acuicultura. Consisten en un cilindro transparente, cerrado en la parte superior y conectado a un sistema de válvulas en la parte inferior, donde se inyecta CO₂ y aire. El diámetro y la altura definirán la relación superficie/volumen y por lo tanto la cantidad de luz recibida que determinará la productividad. Aunque para aumentar la productividad por m² se tiende a incrementar la altura de la columna, esto limita la transferencia de gases, donde columnas mayores de cuatro metros no permiten la correcta mezcla, creándose gradientes de difusión y disminuyendo la productividad (Janssen *et al.*, 2003).

Paneles: De dimensiones variadas, los más comunes tienen 1,5 m de altura y 0,10 m de profundidad, por lo que la ratio superficie/volumen es elevada y permite incrementar la productividad con respecto a otros sistemas (Sierra *et al.*, 2008). Aptos tanto para exteriores como para interiores, son baratos de construir en variedad de materiales transparentes. Pueden presentar problemas de colonización superficial o *fouling*.

Tubulares: Sistemas de disposición horizontal o vertical, consisten en sistemas de tubos cuyo diámetro determinará la luz disponible y cuya longitud se optimiza para maximizar la utilización de CO₂ sin generarse acumulación de O₂. Además de poder tener una relación superficie/volumen elevada, que conduce a elevada productividad, son sistemas que se puede utilizar en el exterior. Sin embargo, hay que atender a la longitud ya que la transferencia de masa es muy baja y los cultivos pueden fotoinhibirse fácilmente. Una manera de incrementar la transferencia de masa, que además permite ejercer cierto control sobre la temperatura, es el empleo de una columna desgasificadora (Acién Fernández *et al.*, 2001).

La productividad de los sistemas de cultivo dependerá de la disponibilidad de nutrientes, de la luz, siendo ésta el factor limitante por lo general, y la velocidad de crecimiento de la especie a cultivar. Así mismo, los factores ambientales determinarán la composición bioquímica de las microalgas producidas (Otero *et al.*, 1992; Otero *et al.*, 1998). En el caso de *T. lutea*, la productividad varía significativamente dependiendo del sistema dónde se cultive y del método de operación del sistema, reportándose valores tan dispares como 0,25 y 1,6 g·L⁻¹·día⁻¹ (Tabla 1).

Dependiendo del sistema de adición de nutrientes y cosechado de biomasa, existen varios sistemas de cultivo (Yeoman *et al.*, 2020):

“Batch”, discontinuo o por lotes. Este sistema, salvo por la adición de CO₂ y/o aire, es un sistema cerrado desde que se inocula con un cultivo diluido de la especie a cultivar y se permite el crecimiento hasta agotar los nutrientes presentes en el medio y se cosecha. La densidad aumenta de forma exponencial (fase logarítmica) hasta que un nutriente se agota o hasta que algún metabolito inhibidor del crecimiento supera el umbral, momento en el cual la densidad se estabiliza (fase estacionaria). Como consecuencia de la variación en la tasa de crecimiento, la composición bioquímica de las células varía durante el ciclo

de cultivo y, por lo tanto, el momento de cosechado determinará las características de la biomasa producida. Generalmente, el cosechado se produce en la fase estacionaria, cuando el perfil bioquímico de las células es el de peor calidad nutricional, pobre en proteína y PUFAs, con una ratio C/N elevada y mayor número de bacterias. Sin embargo, es el sistema más utilizado en el sector de la acuicultura. Una variante de este sistema de cultivo es el *Semi-batch*, donde se retira la mayoría del cultivo y añade medio fresco a intervalos regulares sin dejar que el cultivo alcance la fase estacionaria.

Fed-batch. En este sistema de cultivo, se añaden nutrientes de forma continua sin retirar producto, concentrados, para no diluir el cultivo o diluidos, incrementándose el volumen del cultivo con el tiempo (Lim & Shin, 2013). En microalgas, este sistema se utiliza generalmente en cultivos mixotróficos o heterotróficos para añadir nutrientes orgánicos (Cheirsilp & Torpee, 2012; Li *et al.*, 2018).

Continuo. Consiste en la adición continua de nutrientes y retirada de un volumen equivalente de cultivo. De esta forma, tanto la concentración de nutrientes como la densidad celular permanecen constantes una vez se alcanza el estado de equilibrio o *steady state* en el que la tasa de crecimiento es equivalente a la tasa de dilución.

Desde el punto de vista industrial, el cultivo de microalgas en sistemas continuos es mucho más ventajoso ya que permite la automatización de procesos, reduciendo los costes de operación. Además, permite tener obtener un producto de composición bioquímica estable en cantidad predecible (Borowitzka, 1997; Fábregas, Ferrón *et al.*, 1995; Fábregas *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1995; Otero & Fábregas, 1997; Otero, García & Fábregas, 1997) ya que éstas varían dependiendo de las condiciones de cultivo como la luz disponible (Sukénik *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1991; Tzovenis *et al.*, 1997; Tzovenis *et al.*, 2003), la temperatura (Renaud *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1992), fase del cultivo (Mansour *et al.*, 2005), estado nutricional (Lacour *et al.*, ; Ng & Liu, 2015; Procházková *et al.*, 2013) por lo que tener control sobre los parámetros de cultivo y la tasa de crecimiento permite diseñar el producto con las características deseadas y obtener un suministro fiable. Para un sistema de cultivo dado (con iluminación, temperatura, etc. constante) los dos parámetros que afectan a la productividad y composición bioquímica son la tasa de renovación y la concentración de nutrientes.

Se pueden distinguir distintos sistemas de cultivo continuo dependiendo de cómo se retira parte del cultivo y añade medio:

Turbidostato: La densidad del cultivo se mantiene constante y, añadiendo nutrientes en exceso, se retira la producción en una unidad de tiempo determinada. Es adecuado para sistemas en el exterior en los que la iluminación, temperatura etc. no son constantes. En ocasiones en microalgas la densidad se ajusta a la irradiancia disponible.

Quimiostato: La tasa de dilución es fija y determinará la tasa de crecimiento. La concentración limitante de un nutriente en el medio determinará la densidad máxima, que en bacterias no varía con la tasa de dilución, pero en microalgas sí, al variar la luz disponible por célula.

Semicontinuo. Sistema de cultivo que permite la producción continua, pero retirando una parte del cultivo del reactor y añadiendo igual volumen de medio fresco a intervalos regulares. El porcentaje de cultivo retirado se denomina tasa de renovación. Como la adición de medio fresco no es continua, la concentración de nutrientes no se mantiene

constante. Dado que las microalgas son organismos fotosintéticos generalmente sometidos a periodos circadianos de luz y oscuridad, el sistema semicontinuo es una alternativa recomendada frente al sistema continuo, ya que se produce sincronización de la división celular y los ciclos de renovación se pueden hacer coincidir con los ciclos circadianos, teniendo las células cosechadas una composición bioquímica homogénea y estable, como en los cultivos continuos. Chisholm *et al.*, (1975) propusieron el término “ciclostato” para diferenciar a estos sistemas de cultivo sometidos a ciclos de luz-oscuridad de los cultivos continuos en régimen de quimiostato.

El sistema semicontinuo es además una herramienta poderosa de estudio de las variaciones fisiológicas de las células ya que, a diferencia de los cultivos discontinuos, permite mantener constantes los parámetros de cultivo (luz disponible por célula, concentración de nutrientes...) así como la tasa de crecimiento (Fábregas, Patiño *et al.*, 1995; Fábregas, Patiño *et al.*, 1996; Fábregas *et al.*, 2004). De esta forma, el sistema semicontinuo no sólo permitirá obtener una biomasa de composición estable y homogénea, sino que permitirá controlar la productividad y la composición bioquímica modificando las condiciones de cultivo (Fábregas *et al.*, 1995; Fábregas, Patiño, Vecino *et al.*, 1995; Fábregas *et al.*, 1996; Fábregas, Otero *et al.*, 1996; Fábregas, Cid *et al.*, 1996; Fábregas *et al.*, 1998; Otero & Fábregas, 1997; Otero *et al.*, 1998).

Algunas características de los cultivos semicontinuos son las siguientes:

La productividad será máxima cuando se apliquen tasas de renovación intermedias, debido a que la densidad celular disminuye con el incremento de la tasa de renovación.

El porcentaje de proteína será máximo y permanecerá estable con la tasa de renovación en condiciones de saturación de nitrógeno y aumentará con la tasa de renovación en condiciones de limitación por nitrógeno. De debido a esto, el porcentaje de sustancias de reserva (glúcidos y/o lípidos) disminuye con el incremento de la tasa de renovación en condiciones de limitación por nitrógeno.

El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados se mantendrá estable en condiciones de saturación de nitrógeno y aumentará en condiciones de limitación de nitrógeno con el incremento de la tasa de renovación (Ferreira *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Otero *et al.*, 1997; Otero, García, Morales *et al.*, 1997).

El contenido celular de esteroides disminuirá con el incremento de la tasa de renovación, independientemente de la disponibilidad de nutrientes (Fábregas *et al.*, 1997).

El contenido celular de clorofilas y carotenoides se incrementa con el incremento de la tasa de renovación en condiciones de limitación de nitrógeno, manteniéndose estable la concentración de clorofila por mL. En la mayor parte de las especies, el contenido celular de clorofila se correlaciona con el contenido en PUFA (lípidos estructurales) (Fábregas *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 1998).

Optimización del procesado *Downstream* para su uso en acuicultura – Separación de la biomasa del medio de cultivo

El desarrollo de cultivos en grandes volúmenes de microalgas ha impulsado el estudio de la separación de las células del medio de cultivo, buscando el sistema más eficaz con menor inversión y costes de operación (gasto energético, mantenimiento, limpieza...) que a su vez rinda una biomasa aprovechable en el cultivo (integridad celular, sin toxicidad...)

y que depende de la aplicación de la biomasa. Esta es la parte del proceso de producción de microalgas con mayor coste de operación (Gerardo *et al.*, 2015).

Los métodos empleados para producir los concentrados de microalgas han sido ampliamente estudiados (Barros *et al.*, 2015; Gerardo *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013; Pragma *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013; Zhang Fang, Cheng Lihua, Xu Xinhua, Zhang Lin, Chen Huanlin, 2012).y no han variado mucho desde los años 80 (Shelef *et al.*, 1984; Sim *et al.*, 1988). La eficacia de los distintos sistemas a su vez está asociada a las propiedades de las microalgas, como el tamaño celular (entre 2 μm y 200 μm), la forma, la presencia de flagelos, carga (potencial Z).

Se resumen a continuación los principales métodos de cosechado:

Cosechado por decantación: La biomasa cosechada se introduce en tanques donde las células en suspensión sedimentan al tener una densidad mayor que el agua. Según la ley de Stokes, la velocidad de sedimentación será de 0,1 m/día para partículas esféricas. De esta forma se obtienen una biomasa concentrada con 1-3% de sólidos, sin apenas gasto energético. Sin embargo, debido a la baja velocidad de sedimentación el tiempo necesario para concentrar la biomasa es elevado (más de 24 horas) lo que convierte a la decantación en una técnica poco útil para células pequeñas o con capacidad de movimiento, ya que se mantienen más tiempo en suspensión.

Floculación: Para acelerar la velocidad de sedimentación la forma más barata es la floculación o coagulación que permite la agregación celular para aumentar el tamaño de partícula y por lo tanto su densidad. Para ello, el floculante supera las cargas de repulsión intercelulares. Con distintos métodos de floculación, se puede recuperar a partir de un 90% de la biomasa en suspensión:

La floculación por adición de cationes que superen las cargas de repulsión puede realizarse con sales metálicas de aluminio o hierro (Chen *et al.*, 2013; Eldridge *et al.*, 2012) o por electrofloculación, empleando electrodos de níquel (Shuman *et al.*, 2014), aluminio o hierro (Dassey & Theegala, 2013) por lo que se hace pasar una corriente eléctrica que libera cationes.

Un método muy empleado es la floculación con polímeros como quitosano (Chen *et al.*, 2013), *Cassia* (Banerjee *et al.*, 2014) o poliacrilamida (Banerjee *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Eldridge *et al.*, 2012).

También se ha propuesto la biofloculación con otros organismos (Lee *et al.*, 2009a; Lee *et al.*, 2009b; Salim *et al.*, 2011) o con moléculas extraídas de las propias microalgas, como Alam *et al.*, (2014) que utilizaron extracto de *Chlorella vulgaris* como autofloculante. La autofloculación también puede realizarse por incremento de pH (cargas $-\text{OH}$) dejando que el cultivo consuma todo el CO_2 (González-Fernández & Ballesteros, 2013) o añadiendo agentes alcalinizantes como amoníaco (Chen *et al.*, 2012a) o hidróxido de sodio (Eldridge *et al.*, 2012).

Otros métodos en estudio incluyen la aplicación de ultrasonidos (Bosma *et al.*, 2003), el magnetismo con cámaras magnéticas (Hu *et al.*, 2014) o con nanopartículas (Hu *et al.*, 2013)

Sin embargo, la floculación tiene el gran inconveniente de la difícil dosificación (Chen *et al.*, 2013) e imprevisibilidad del resultado ya que es altamente sensible al estado del cultivo (Salim *et al.*, 2013) y su eficacia disminuye con el incremento de la concentración

de biomasa, probablemente debido a la acidificación del medio como consecuencia de la liberación de materia orgánica (Beuckels *et al.*, 2013). En el caso de las aplicaciones en acuicultura los sistemas tradicionales dejan residuos del floculante que podría tener efectos perniciosos sobre los organismos que fueran a ser alimentados con esta biomasa como vieron Coutinho *et al.* (2009) en *Carassius auratus*, donde la microalga floculada con quitosano empeora la digestibilidad. Además, algunos tipos de floculantes afectan a la viabilidad e integridad celular (Anthony *et al.*, 2013), potencialmente reduciendo la caducidad de los concentrados.

Otro sistema que utiliza la agregación celular es la flotación que, aprovechando la baja densidad de las microalgas y la presencia de un alto contenido lipídico en vesículas, mediante burbujas de pequeño tamaño generadas en el fondo del tanque, hace flotar las células. Sin embargo, el éxito de esta técnica también está ligado al tamaño de partícula y se ve afectado por la composición bioquímica, siendo inviable para cultivos de células grandes (Garg *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 1962). Además, en la mayoría de los casos es necesario agregar surfactantes.

Un sistema que comienza a popularizarse es la filtración, que implica una barrera semipermeable con un tamaño de poro determinado que retendrá las partículas dejando pasar el medio de cultivo. El tipo más empleado es la microfiltración tangencial, ya que minimiza el bloqueo de los poros. La biomasa concentrada que se obtiene presenta alta viabilidad e integridad celular pero los costes de instalación y operación son elevados y variables dependiendo de la presión necesaria, el área del filtro y la concentración inicial de biomasa. Fueron necesarios hasta $2,23 \text{ kWh} \cdot \text{m}^{-3}$ para concentrar un cultivo de $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de *Scenedesmus* sp (Gerardo *et al.*, 2013).

Un método que es menos sensible al tamaño celular, carga electrostática y estado del cultivo, que no deja residuos, es más rápido y está ampliamente implantado en otras industrias es la centrifugación. Ésta hace uso de la fuerza centrífuga para acelerar la velocidad de sedimentación, pudiéndose adaptar a ser respetuosos con la viabilidad e integridad celular. El mayor problema que presenta esta tecnología son los elevados CAPEX y OPEX debido a la limpieza y gasto energético, aunque el avance en esta industria ha permitido el procesamiento con un gasto energético inferior a $1 \text{ kWh} \cdot \text{m}^{-3}$. Este es el método que más se está extendiendo en las distintas plantas de producción de microalgas (Barros *et al.*, 2015). Las centrifugas de discos son ideales para separar partículas de entre 3 y $30 \mu\text{m}$ en cultivos con baja concentración (a partir de $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) con consumos en torno a $1,4 \text{ kWh} \cdot \text{m}^{-3}$ (Milledge & Heaven, 2013).

Metodologías de preservación de microalgas

Las necesidades de los criaderos en acuicultura no son continuas sino que aumentan de otoño a primavera, justo cuando la productividad de los sistemas de cultivo de microalgas disminuye debido al descenso de la disponibilidad de luz natural y de la temperatura. Sin embargo, debido a la falta de diversidad, estabilidad en la calidad y disponibilidad de los productos basados en microalgas, la tendencia en acuicultura es continuar con la producción *in situ* o sustituir las microalgas y alimento vivo por dietas artificiales (Knauer & Southgate, 1999). Sin embargo, esto no es posible para muchas especies, como los bivalvos, que sólo aceptan parcialmente las dietas formuladas (Nevejan *et al.*, 2007). Por ello, las necesidades de microalga y alimento vivo siguen aumentando con el aumento de la demanda de las especies cultivadas (FAO, 2020).

Como alternativa a la producción *in situ* en sistemas baratos y manejables, se presenta la posibilidad de que personal especializado con instalaciones altamente productivas generen un producto basado en microalgas que pueda conservarse y utilizarse fácilmente en los criaderos. El uso de microalgas concentradas y preservadas facilitará el trabajo reduciendo los costes de operación en los criaderos.

Para ello es necesario generar un producto con una vida media elevada y con características tanto bioquímicas como físicas y morfológicas similares a las de la microalga sin procesar, que produzca los mismos resultados o mejores de supervivencia y tamaño en los organismos de acuicultura. Los parámetros a tener en cuenta para el desarrollo de productos microalgales para acuicultura son:

- Composición bioquímica adecuada y estable
- Digestibilidad
- Tamaño de partícula adecuado
- Mantenimiento en la columna de agua
- Integridad celular
- Ausencia de toxicidad y de introducción de parásitos
- Precio
- Disponibilidad todo el año

Para conservar las microalgas generalmente se utilizan métodos que son adaptaciones de los empleados para la conservación de alimentos:

La pasteurización, donde la biomasa es sometida a elevadas temperaturas y un posterior enfriamiento rápido, sellando herméticamente el recipiente, detiene los procesos enzimáticos permitiendo la preservación. En *Arthrospira platensis* no hay diferencias en la composición bioquímica de la biomasa tratada por este método y la liofilizada o secada por aerosol (*spray-dried*) (Morist *et al.*, 2001).

La refrigeración consiste en la conservación de la biomasa microalgal en cámara frigorífica entre los 2 y los 8 °C, generalmente en forma de concentrados. Aunque esta es la forma más común de comercializar microalga para su uso en acuicultura o acuariofilia, pocos estudios determinan la evolución de las propiedades nutricionales con el paso del tiempo. Se acepta generalmente que la biomasa o los concentrados de microalgas refrigerados tienen una caducidad de 4 a 6 semanas, sin producirse cambios significativos en la composición bioquímica o en los resultados sobre los organismos cultivados con ella (Nunes *et al.*, 2009; Ponis *et al.*, 2008; Ponis *et al.*, 2003).

La congelación permite la paralización de la mayoría de la actividad enzimática. La viabilidad de las células tras la descongelación es muy pequeña (Paredes *et al.*, 2013). El impacto de las condiciones de almacenamiento y los efectos de los aditivos sobre la calidad y extensión de la vida media de concentrados se ha demostrado impredecible y altamente específico de la cepa (Heasman *et al.*, 2000). Los parámetros que afectan a la viabilidad celular tras la congelación son la densidad celular en el momento de la congelación, de forma que la viabilidad celular tras descongelar la biomasa desciende con el incremento de la densidad, la naturaleza de la pared celular, el uso de crioprotectores, que permite disminuir el estrés osmótico durante la congelación (Brand & Diller, 2004) y la velocidad de congelación que afecta a la formación de hielo intracelular y extracelular, sometiendo a las células a estrés osmótico.

Está generalmente aceptado que cuanto mayor es la tasa de enfriado en la fase de congelación, menor es el daño producido ya que los cristales que se forman son pequeños y amorfos, aunque Cañavate & Lubián (1995a; 1995b) proponen una explicación al daño celular por congelación opuesta al modelo mayoritariamente aceptado.

La liofilización, que se desarrolló para disminuir la pérdida de los aromas en los alimentos en productos que se pueden preservar a largo plazo, consiste en la congelación del producto y posterior sublimación de los cristales de hielo bajo vacío. Como el proceso transcurre en ausencia de aire y baja temperatura, se previene el deterioro por oxidación. La preconcentración del producto para eliminar la mayor parte del agua antes de liofilizar agiliza el proceso. La etapa de congelación es crucial ya que, si es inadecuada o insuficiente, el agua no sublimará, sino que evaporará, formándose texturas gomosas en el producto final. El resultado es un producto con una mínima cantidad de agua con un tiempo de almacenamiento virtualmente ilimitado que conserva la mayoría de las propiedades físicas, químicas y biológicas del producto original, si requerir refrigeración. Puede volver a su forma original tras la rehidratación del producto (Mellor, 1978).

Estudiar el efecto de la liofilización sobre la composición bioquímica de las microalgas ha revelado que, debido a la congelación o al propio proceso de liofilización, la biomasa sufre una pérdida en el contenido de proteína y glúcidos (Babarro *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque este autor encontró un descenso de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, otros resultados no corroboran dicha pérdida (Molina Grima, Sánchez Pérez *et al.*, 1994a), sugiriendo que el sistema y condiciones de cultivo podría tener un efecto sobre la resistencia a la liofilización.

El *spray-drying* o secado por aerosol consiste en la producción de un polvo seco a partir de un líquido o pasta bombeable por secado rápido con un gas caliente. El líquido es dispersado con un atomizador y sometido a un flujo de gas caliente que puede ser aire o un gas inerte como nitrógeno. Debido a que el secado es rápido, el tiempo de exposición a altas temperaturas es corto por lo que no se produce degradación de moléculas termosensibles. Además, por las características inherentes a la atomización, el tamaño de partícula producido es consistente y se puede elegir (Mujumdar, 2007).

Producción en acuicultura con microalgas preservadas

Como alternativa a la producción *in situ* que requiere instalaciones adecuadas y mano de obra especializada, lo que dificulta y encarece la producción, se han probado distintos productos con más o menos éxito (Coutteau & Sorgeloos, 1992). Frente a la ventaja de poder disponer de producto cuando es necesario se presenta la dificultad de que se mantenga en la columna de agua o de que se pueda resuspender sin comprometer la

integridad celular, además de las pérdidas en el valor nutricional debido al sistema de concentrado y preservado.

En moluscos se ha experimentado con microalga refrigerada (McCauley *et al.*, 1999; Nell & O'Connor, 1991; Ponis *et al.*, 2008; Ponis, Robert, Parisi & Tredici, 2003), liofilizada (Albentosa *et al.*, 1997) y secada por *spray* (Knauer & Southgate, 1996) en distintas etapas del ciclo y con resultados variables que pueden deberse tanto a la forma de presentación como a la forma de cultivar la microalga antes de ser procesada o incluso a la selección de las especies. Knuckey *et al.*, (2006) determinaron que, aunque aceptable para el cultivo de *Crassostrea gigas* y *Pecten fumatus*, la calidad de la biomasa concentrada por floculación por incremento de pH junto con un polímero comercial era inferior a la misma dieta sin concentrar.

En cuanto a la utilización de preparados microalgales para el cultivo de rotífero, debido a que se trata de un organismo filtrador no selectivo (Rothhaupt, 1990), en la mayoría de los criaderos se cultiva con levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) ya que es barata y fácil de conseguir y almacenar, así como con dietas secas formuladas. Existen en el mercado algunas formulaciones de alimento seco para el cultivo de los rotíferos como por ejemplo Culture Selco Plus de Inve Belgium (www.inve.com) u Ori-Culture de Skretting. (www.skretting.com). Sin embargo, numerosos estudios demuestran que los rotíferos alimentados con microalgas tienen una mayor tasa productiva frente a los alimentados con levaduras (Caric *et al.*, 1993; Dhert *et al.*, 2001; Lubzens *et al.*, 1995; Tamaru *et al.*, 1991) y que la alimentación con levaduras produce rotíferos con un menor porcentaje de lípidos que las dietas de microalgas marinas y éstos carecen de PUFAs de cadena larga (Ben-Amotz *et al.*, 1987). Además, el contenido de vitaminas del rotífero aumenta al cambiar su dieta de una levadura a una microalga (Lie *et al.*, 1997), de forma que los requerimientos de las larvas se ven cubiertos sin necesidad de un ulterior enriquecimiento.

Al igual que en moluscos, en rotífero se han probado diversas formas de presentación, incluyendo pastas refrigeradas (Gallagher *et al.*, 2001; Maruyama *et al.*, 1997; Yoshimura *et al.*, 1997), biomasa congelada (Lubzens *et al.*, 1995; Seychelles *et al.*, 2009), liofilizada (Cañavate & Fernández-Díaz, 2001; Gatesoupe & Luquet, 1981; Navarro & Sarasquete, 1998; Navarro, 1999; Yúfera & Navarro, 1995) y secada por *spray* (Gatesoupe & Luquet, 1981) con resultados variables.

Disponer de productos basados en microalgas, con todas las ventajas de la compleja y eficaz composición bioquímica y con una forma de conservación y dosificación y precio similar a formulaciones artificiales o levadura de pan facilitaría el cultivo de rotífero sin comprometer la calidad nutricional.

Producción de *T. lutea* para acuicultura

T. lutea e *I. galbana*, indistinguibles por microscopía óptica y cultivadas casi indistintamente como alimento en acuicultura, tienen rangos de temperatura de crecimiento distintos, con óptimos referenciados en 22 °C para *I. galbana* (Ewart & Pruder, 1981) y 27 °C para *T. lutea* (Nelson *et al.*, 1992; Renaud *et al.*, 1995; Sayegh *et al.*, 2007; Sayegh & Montagnes, 2011; Thompson *et al.*, 1992). Aunque hay trabajos que comparan estas dos especies a diferentes temperaturas, los datos presentados corresponden a cultivos *batch* de baja densidad, por lo que es necesario corroborar este comportamiento en sistemas de cultivo semicontinuo de altas densidades, más parecidos a las condiciones industriales de producción en fotobioreactores de alto rendimiento, donde las variaciones de la temperatura durante el día y el año tendrá un impacto sobre

las productividades (Masojídek *et al.*, 1999). Además, al no haber consenso sobre el efecto de la temperatura sobre los perfiles bioquímicos y de ácidos grasos (Renaud *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 1995) (Thompson *et al.*, 1992), es necesario realizar un estudio comparativo para poder seleccionar la mejor especie para unas condiciones de cultivo y/o unos requerimientos nutricionales dados.

Igualmente, aunque *T. lutea* se cultiva con éxito en medios convencionales como Algal, Walne o f/2, entre otros (Herrero *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2000), al tratarse de medios generales, no se ha optimizado su composición para cultivos semicontinuos de alta densidad, desconociéndose los requerimientos para determinados elementos y vitaminas y la viabilidad de utilizar distintas fuentes de nitrato o fertilizantes agrícolas en estas condiciones, que abarataría los costes de producción y simplificaría la preparación de medio de cultivo (Acién Fernández *et al.*, 2012). Por tanto, sería interesante comprobar en cultivos controlados de *T. lutea* el efecto de elementos no utilizados habitualmente en el medio, como el boro, calcio, magnesio, selenio y cromo. Así mismo, es necesario determinar los requerimientos de vitaminas, comparar el crecimiento con distintas fuentes de nitrato y verificar la viabilidad de utilizar un fertilizante agrícola para el cultivo de esta especie.

A la hora de cultivar a nivel industrial en sistemas exteriores, *T. lutea* presenta dificultades para mantener cultivos estables y productivos (Van Bergeijk *et al.*, 2010). Además, los datos de productividad publicados hasta el momento de cultivo de *T. lutea* en diferentes sistemas son difíciles de comparar al estar en ubicaciones diferentes, con distinta iluminación y temperatura. Por ello es necesario realizar una comparación de varios sistemas de cultivo en distintas épocas del año y comparar con otras especies de referencia, como pueda ser *I. galbana*, para garantizar la viabilidad todo el año de los cultivos con productividades máximas.

Independientemente de mejorar la producción *in situ*, sería interesante que los acuicultores dispusieran de *T. lutea* durante todo el año, presentada en formatos concentrados de alta durabilidad, como ya se dispone de otras microalgas. La carencia de una pared celular definida (Liu & Lin, 2001) convierte a *T. lutea* en una microalga difícil de procesar, siendo algunos de los parámetros identificados como responsables del daño celular en el procesamiento, y por tanto objetivo de optimización, la fuerza centrífuga (Heasman *et al.*, 2000), y la temperatura de congelación (Cañavate & Lubián, 1995a,b). Además, no hay referencias al efecto que el estado nutricional de las células pudiera tener sobre su resistencia al procesado o si se puede mejorar la durabilidad de la biomasa modificando los parámetros de concentrado, refrigeración, congelación y/o liofilización o utilizando atmósferas protectoras.

Por tanto, la presente tesis doctoral tratará de optimizar las condiciones de cultivo y procesado de *T. lutea* para su uso en criaderos de acuicultura.

Tabla 1 Ejemplos de sistemas de cultivo empleados para la producción de *T. lutea* e *I. galbana*

Fotobioreactor	Especie	Productividad	Referencia
Columna de vidrio 2,6 cm diámetro y 1,50 m de alto. Turbidostato	ISOCH-1 (<i>T. lutea</i> según UTEX)	1,6 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Qiang & Richmond, 1994)
Tubular horizontal 2,6 cm diámetro y 80,8 m largo. Semi-batch cada 4 días	<i>I. galbana</i> ALII-4	0,32 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Molina Grima, Sánchez Pérez <i>et al.</i> , 1994b)
Quimiostato $\mu = 0,5 \text{ día}^{-1}$	<i>I. galbana</i> ALII-4	0.1 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Molina Grima, Perez <i>et al.</i> , 1994)
Tubular horizontal 6,4 cm diámetro y 60 m. <i>Batch</i>	<i>T. lutea</i> (IFAPA, Cádiz, Spain)	15,7 a 8,6 ·10 ⁶ cél·mL ⁻¹ / 0,4 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Van Bergeijk <i>et al.</i> , 2010)
Reactor con difusión de luz por fibra óptica	<i>T. lutea</i> LB 2307	0,5 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Burgess <i>et al.</i> , 1993)
Raceway de 12 cm de profundidad	ISOCH-1 (<i>T. lutea</i>)	0.25 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Boussiba <i>et al.</i> , 1988)
Planel 300 L y 20 cm de paso de luz, en ciclostato TR=10% día ⁻¹ .	<i>I. galbana</i> (Israel Oceanographic and Limnological Research Center)	0,13 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Zhang & Richmond, 2003)
Open pond 150 L	<i>I. galbana</i> (Israel Oceanographic and Limnological Research Center)	0.07 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Kaplan <i>et al.</i> , 1986)
Bolsa de 500 L en quimiostato TR=10% día ⁻¹ .	<i>T. lutea</i> CCAP 927/14	190·10 ⁶ cél·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Jacobsen <i>et al.</i> , 2010)
Tubular vertical 3 m ³ , 9 cm diámetro, en ciclostato TR=15-35% día ⁻¹	<i>T. lutea</i> CCMP 1324	0,15- 0,25 g·L ⁻¹ ·día ⁻¹	(Ippoliti <i>et al.</i> , 2016)





OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es optimizar las condiciones de cultivo de *Tisochrysis lutea* para asegurar la estabilidad de su cultivo industrial y determinar el impacto del procesamiento del cultivo en productos concentrados para su uso en acuicultura.

Los objetivos específicos incluyen:

1. Evaluar el impacto de la temperatura de cultivo sobre la productividad, la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos, y comparar con *I. galbana*.
2. Optimizar la composición del medio de cultivo, determinando la mejor fuente de nitrato y la necesidad de añadir microelementos o vitaminas.
3. Evaluar la idoneidad y optimizar la composición de fertilizantes agrícolas para el cultivo industrial de *T. lutea*.
4. Comparar la productividad de *T. lutea* en distintos sistemas industriales de cultivo en dos épocas del año.
5. Evaluar el impacto del procesamiento con centrifugas industriales y atmósferas protectoras sobre la durabilidad de productos concentrados de *T. lutea*.
6. Evaluar el impacto de la centrifugación, conservación a distintas temperaturas y liofilización sobre la durabilidad y aceptación por parte del rotífero de productos concentrados de *T. lutea*.



MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de las especies utilizadas

***Isochrysis galbana* Parke y *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert**

Ambas especies pertenecen a la división Prymnesiophyta, Clase Prymnesiophyceae (antes Haptophyceae), Orden Isochrysidales, Familia Isochrysidaceae.

El Orden Isochrysidales es un grupo monofilético de microalgas (Edwardsen *et al.*, 2000) que son únicas en la producción de un tipo particular de alquenonas de cadena larga insaturadas C37-C39 (Marlowe *et al.*, 1984) y poseen una lámina membranosa delgada en el retículo endoplasmático, bajo el plasmalema (Van der Wal *et al.*, 1985). Tienen un haptonema con tres membranas concéntricas rodeando de 3 a 7 microtúbulos, dos flagelos, cloroplastos rodeados de retículo endoplasmático que también rodea al núcleo, con un pirenoide en su interior y tres tilacoides. Tiene crisolaminarina (beta 1,3 glucano) como sustancia de reserva. El perfil de pigmentos está compuesto por clorofila a, c1, c2 diadinoxantina, diatoxantina, fucoxantina y betacaroteno. La célula está recubierta por una o varias capas de escamas orgánicas.

La familia Isochrysidaceae es un grupo de microorganismos de células no calcificadas (Pascher, 1910) con cuatro géneros, *Chrysotila*, *Dicrateria*, *Isochrysis* y *Tisochrysis* que tienen en común que presentan un haptonema rudimentario recubierto por escamas de proteína y glúcidos de 1 a 2 μm y dos flagelos iguales lisos con inserción apical o subapical. Esta familia se ha descrito de cultivos aislados en aguas costeras y estuarinas con poca información sobre su biogeografía y diversidad (Bendif *et al.*, 2013).

***Isochrysis galbana* Parke**

Aislada por M. Parke en 1938 en el Mar del Norte cerca de la Isla de Man (Parke, 1949), la especie *Isochrysis galbana* presenta células asimétricas con dos membranas nucleares, un cloroplasto de color dorado, haptonema rudimentario compuesto por 5 microtúbulos, dos flagelos ligeramente desiguales, y un complejo de Golgi (Bendif *et al.*, 2013; Hori & Green, 1985).

El contenido de esteroides de esta especie es 99% epibrasicasterol (Patterson *et al.*, 1994) y en cuanto al perfil de ácidos grasos, cabe destacar la presencia de 18:4 ω 3, 20:5 ω 3 y 22:6 ω 3 (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989), lo que la convirtió en una cepa interesante nutricionalmente para cultivo de larvas de moluscos, siendo ésta la primera especie cultivada para ese fin (Bruce *et al.*, 1940) y usándose satisfactoriamente en bivalvos (Enright *et al.*, 1986) hasta convertirse en una de las microalgas más usadas en maricultura (Sukenik & Wahnou, 1991).

La cepa utilizada CCAP 927/1 se encuentra depositada en otras colecciones (CCMP 1323, UTEX 987, SMBA 58)

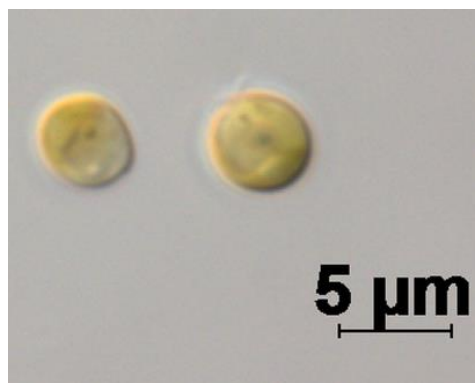


Fig. 1 *Isochrysis galbana* Parke CCAP 927/1. Cortesía de la Colección de Cultivo de Algas y Protozoos (CCAP) <https://www.ccap.ac.uk>

***Tisochrysis lutea* Bendif et Probert**

Fue recolectada por J. Martin y aislada por K. Haines en 1977 en el Pacífico Sur, cerca de Tahití (NCMA). Esta cepa ha sido considerada como una cepa de *Isochrysis galbana* y es conocida popularmente como *Isochrysis* sp. Clon T-ISO o *Isochrysis* aff. *galbana* CLON T-ISO.

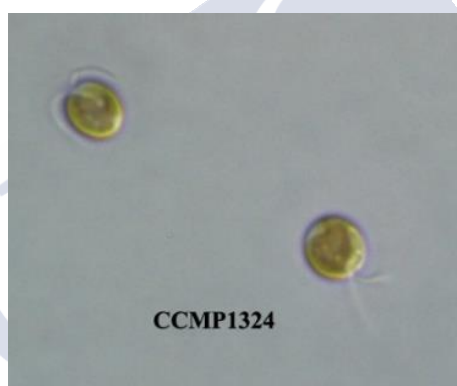


Fig. 2 *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert CCMP 1324. Cortesía del Centro Nacional para Algas Marinas y Microbiota Provasoli-Guillard (NCMA) <https://ncma.bigelow.org>

Recientemente ha sido clasificada como una especie independiente ya que, a pesar de ser morfológicamente similar a *I. galbana*, presenta diferencias a nivel de ultraestructura, además de las conocidas diferencias en los perfiles de ácidos grasos y esteroides, careciendo prácticamente de EPA, ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (Brown *et al.*, 1989) y presentando un 99% brasicasterol (Patterson *et al.*, 1994). Otras características que las diferencian son la coloración del cloroplasto anaranjada frente al marrón dorado de *I. galbana*, la excreción de una capa mucilagínosa por las células no móviles y las diferencias del ARNr SSU mayores al 1% (Bendif *et al.*, 2013). El rango de temperatura de crecimiento también es diferente, habiéndose establecido un mejor crecimiento de *I. galbana* en aguas más frías que *T. lutea* (Ewart & Pruder, 1981) en cultivos *batch*.

Sin pared celular, un tamaño medio de 5 μ m y reservas de lípido en fase estacionaria en gotas intracelulares (Liu & Lin, 2001), presenta células móviles, doradas con una depresión apical en la que se insertan los flagelos, isocontos de 7 μ m de largo. Con una capa de escamas orgánicas de 100 nm de espesor. Su haptonema está compuesto por tres o cuatro microtúbulos entre una capa de retículo endoplasmático. Tiene uno o dos

cloroplastos unidos al núcleo por la membrana plastidial con un pirenoide con forma de prisma su interior (Bendif *et al.*, 2013).

En criaderos de larvas de bivalvos tropicales, se utiliza en lugar de *I. galbana* ya que presenta la ventaja de poder crecer a mayores temperaturas, cercanas a 30°C, siendo el máximo descrito para *I. galbana* 27°C en cultivos *batch* (Helm & Laing, 1987), sin diferencias en el valor nutritivo para *Ostrea edulis* (Helm *et al.*, 1973).

La cepa utilizada CCMP 1324 también se encuentra depositada en otras colecciones (CCAP 927/14, UTEX 987, SMBA 58).

***Brachionus plicatilis* Müller**

Los rotíferos utilizados en acuicultura pertenecen al Phylum Rotifera Clase Monogononta, Orden Ploima, Familia Brachionidae, Género Brachionus.

Como revisado por Wallace (2002), el Phylum Rotifera o Rotatoria agrupa tres clases (Scisonidea, Bdelloidea y Monogonta) comprendiendo en torno a 1850 especies descritas de organismos tradicionalmente considerados pseudocelomados que actualmente están clasificados como metazoos protóstomos y con una talla que oscila entre 50 µm y 2 mm. Generalmente presentes en ambientes húmedos o semiacuáticos, existen especies de vida libre planctónicas, bentónicas o incluso sésiles y formando colonias.

Una de las razones por las que se consideró a este grupo de organismos como pseudocelomados es la eutelia o constancia en el número de células que constituyen el cuerpo, que está alrededor de mil. La división celular cesa, permitiendo el incremento de tamaño del organismo sólo por incremento del volumen celular e impidiendo de este modo la regeneración celular.

De simetría bilateral, el cuerpo de los rotíferos se divide en cabeza, tronco y pie terminal. La característica definitoria de este Phylum es la corona, una estructura ciliada en la parte anterior (Rotifera, del latín rota+ferre, “portador de rueda”). La segunda característica definitoria es el “mástax” o faringe musculada con mandíbulas quitinosas o “trophi”. Las mandíbulas están formadas por siete piezas articuladas. El pie presenta una cutícula alrededor y, en las formas de vida libre, acaba en uno a cuatro dedos. Tiene una glándula que segrega una sustancia adhesiva que permite al rotífero fijarse al sustrato de forma transitoria. El integumento sincitial, compuesto de proteínas similares a la queratina, recubre todo el cuerpo, salvo la corona. Esta cutícula, cuando se presenta engrosada forma una estructura llamada lórica.

La boca, situada en posición central, está rodeada por parte de la corona y se continúa con un tubo bucal ciliado que la conecta con la faringe. El esófago, tubular, conecta la faringe con el estómago, que puede tener forma de saco ciliado o ser un tubo de paredes gruesas. El intestino es corto y acaba en la parte posterior del cuerpo, formando una cloaca en la que confluyen también los protonefridios y el oviducto.

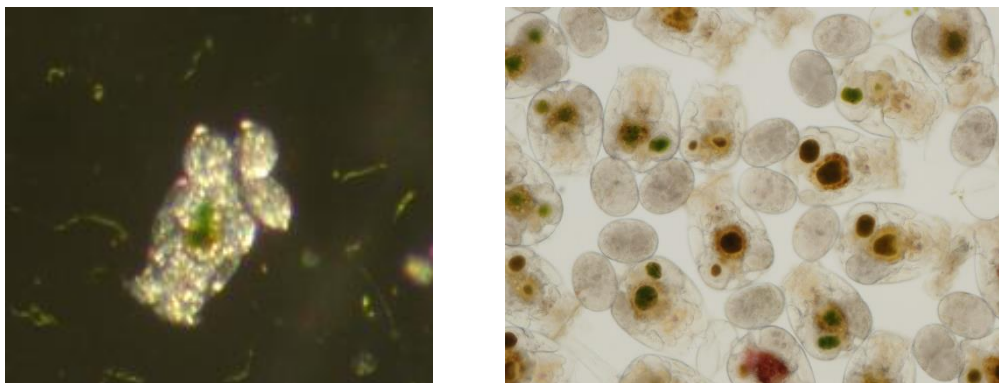


Fig. 3 *Brachionus plicatilis* O.F. Müller

Los protonefridios conforman el aparato excretor que acaba en una cloaca. Al ser organismos acuáticos y de muy pequeño tamaño, los rotíferos carecen de sistema respiratorio y circulatorio.

El sistema nervioso presenta un cerebro pequeño, situado por encima de la faringe, del que sale una serie de nervios que se extienden por el cuerpo. Estos cordones nerviosos están formados por nervios motores y sensoriales. El número de nervios varía entre especies. Típicamente tienen dos pares de antenas y hasta cinco células fotorreceptoras. Poseen sedas sensibles al tacto cerca de la corona.

Aunque los rotíferos de la clase Bdelloidea sólo presentan partenogénesis ameiotica siendo diplodes, los de la clase Monogonta son haplodiploides y presentan una partenogénesis cíclica (Aparici *et al.*, 2001) donde la mayor parte del tiempo se producen huevos diplodes. Como respuesta a estímulos medioambientales como la temperatura y la salinidad (Snell, 1986) o incluso a una molécula liberada que alcanza la concentración umbral con el incremento en la densidad poblacional (Snell *et al.*, 2001), se desencadena la reproducción sexual donde estos huevos amícticos producen hembras míticas, de morfología diferente a las amícticas y que producen por mitosis huevos haploides, míticos, que en ausencia de fecundación dan lugar a machos. Estos machos fecundan a las hembras míticas, que producirán huevos diploides dotados de una cubierta gruesa, permaneciendo como formas de resistencia que darán hembras míticas o amícticas (Barnes *et al.*, 1968).

Los rotíferos son organismos filtradores no selectivos que se pueden alimentar de bacterias, microalgas y detritus en suspensión, pero se ha descrito que el tamaño máximo de partícula que pueden ingerir es 15 μm (Hirayama & Nakamura, 1976).

De la clase Monogonta está muy extendido el uso de *Brachionus calyciflorus* para estudios ecotoxicológicos y *Brachionus plicatilis* (L) y *Brachionus rotundiformis* (S) para acuicultura (Yúfera, 2001).

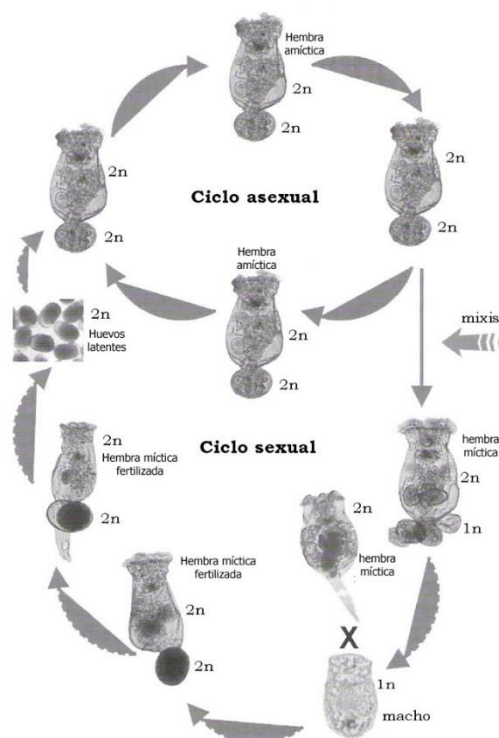


Fig. 4 Ciclo biológico del rotífero. Modificado de Lubzens (2003). Copyright (2021) por Wiley Books.

La taxonomía de *B. plicatilis* ha sido ampliamente estudiada (Ruttner-Kolisko, 1974). Es una especie de vida libre, de 240 μm de largo y 170 μm de ancho en estado adulto. Pueden alimentarse de diversos tipos de partículas como microalgas, bacterias, levaduras o micropartículas artificiales, ya que la selección de alimento la realizan en función del tamaño de la partícula, donde los individuos de mayor tamaño prefieren partículas más grandes (Rothhaupt, 1990). Esta especie es eurihalina y euriterma. Su rango de salinidad y temperatura tolerado está entre el 0,1 y el 6%, con una mayor tasa reproductiva entre el 0,4 y el 3,5% para la salinidad (Walker, 1981) y entre los 25 y los 35 $^{\circ}\text{C}$, pueden tolerar un pH entre 5 y 10 y su concentración óptima de oxígeno en el agua está comprendida entre 5 y 7 ppm (Lubzens, 1987).

Los rotíferos se utilizan como alimento para las larvas de peces, por su tamaño, su rápido crecimiento, su adecuada velocidad de natación y por su digestibilidad, que los convierten en presas adecuadas en el inicio de la alimentación exógena de las larvas. Además, la composición bioquímica de los rotíferos se puede modular para adecuarla a los requerimientos nutricionales de las larvas mediante la alimentación (Ferreira *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011; Whyte *et al.*, 1994).

Los rotíferos utilizados en el presente trabajo proceden de las instalaciones de INSUIÑA S.L en Mougás, Oia (Pontevedra).

Sistemas de cultivo de microalgas

Cultivos de laboratorio

Se utilizaron unidades tubulares de cultivo de vidrio, de fondo cóncavo y 30 mm de diámetro con 80 mL de volumen de cultivo y botellones esféricos de fondo plano y 25 cm de diámetro con 5 L de volumen.

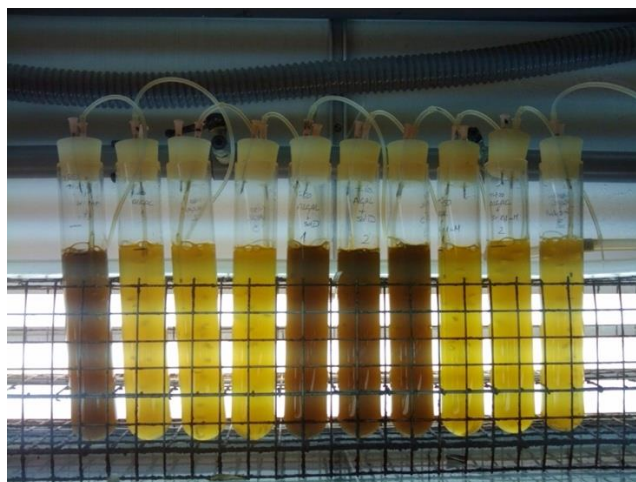


Fig. 5 Sistemas de cultivo tubulares de 80 mL de volumen

Cada tubo o botellón se conectó a un sistema de aireación que proporcionó un flujo de aire continuo de $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ o $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente, suplementado durante el periodo de luz con pulsos de CO_2 de 10 s de duración cada 10 minutos, para proveer a los cultivos de una fuente de carbono inorgánico y mantener el pH en torno a 7,8-8. Los biorreactores se mantuvieron en una cámara de cultivo a una temperatura constante de $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo circadiano de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. La fuente de luz fue una serie de tubos fluorescentes Mazda Fluor Lumière du Jour 36W/LJ. La intensidad luminosa se midió con un luxímetro Neurtext HD 8366 y se utilizó el factor de conversión propuesto por Ginzburg (1987), $1 \text{ } \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} = 51,2 \text{ lux}$.

Los medios de cultivo se prepararon autoclavando a 121°C durante 21 minutos agua de mar de salinidad ajustada a 3,5% con un refractómetro Atago S/mill. Una vez fría, se enriqueció con distintas sales y vitaminas.

El medio de control utilizado fue el ALGAL 4 mM: NaNO_3 , 4mM; NaH_2PO_4 , 0,22 mM; ZnCl_2 , 2,29 μM ; MnCl_2 , 3,4 μM ; NaMoO_4 , 2,72 μM ; CoCl_3 , 0,38 μM ; CuSO_4 , 0,46 μM ; citrato férrico, 21,2 μM , tiamina, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; biotina, $13,4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, vitamina B_{12} $9,4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; EDTA, $4,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (modificado de (Fábregas *et al.*, 1984). Ocasionalmente esta formulación se utilizó a doble concentración (8 mM).

Los fotobiorreactores se inocularon con una densidad inicial de microalgas correspondiente al 10% de la densidad celular máxima estimada para fase estacionaria. Los cultivos se dejaron crecer hasta el final de la fase logarítmica o estacionaria temprana. Se entiende que un cultivo está en fase estacionaria cuando su densidad celular no varía en tres días. En ese momento se inició el régimen semicontinuo que consiste en retirar diariamente una parte del cultivo sustituyéndolo por medio fresco. Esta operación se realiza durante la primera hora del ciclo de luz ya que, según los estudios existentes, es el momento más conveniente para garantizar la estabilidad del cultivo y un buen perfil

bioquímico (Fábregas *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 1992; Otero *et al.*, 1998). El porcentaje de volumen de cultivo que se retira se denomina tasa de renovación. Se considera que el cultivo alcanza la fase de equilibrio (*steady state*) cuando la densidad celular se mantiene constante durante por lo menos tres días consecutivos.

Cultivos industriales

Los cultivos industriales se llevaron a cabo en la Estación Experimental Las Palmerillas (El Ejido, Almería) durante los meses de julio y noviembre de 2011, dentro de un invernadero. El pH y la temperatura se controlaron mediante un sistema de electroválvulas con una sonda pH5083Y (Crison, España) dentro de cada reactor y conectada a un multímetro MM44 (Crison, España). Los cultivos se airearon de forma continua y se suplementaron con CO₂ a demanda para mantener el pH en 7.8. La temperatura se programó en 25 °C, por encima de la cual se activaba un sistema de recirculación de agua fría por intercambiadores de calor de acero inoxidable dentro de los fotobiorreactores.

El medio de cultivo se preparó con agua de riego filtrada a la que se le añadió sal marina (Yara, España) a una concentración de 3 y que se enriqueció con fertilizantes agrícolas nitrato de calcio y nitrato de sodio YaraLiva, fosfato de potasio, sulfato de magnesio (Yara, España) y micronutrientes Welgro hydroponic (Massó Agro, España), se esterilizó con ozono y posteriormente se suplementó con vitaminas:

NO₃⁻ 13,84 mM; KH₂PO₄ 2,2 mM; Mg²⁺ 3,01 mM; Ca²⁺ 5,09 mM; SO₄²⁻ 1,46 mM; BO₃³⁻ 0,03 mM; Zn²⁺ 5,73 μM; Mn²⁺ 5,85 μM; MoO₄²⁻ 0,82 μM; Cu²⁺ 0,8 μM; Fe³⁺ 16,12 μM, tiamina, 0,14 mg·L⁻¹; biotina, 20 μg·L⁻¹, vitamina B₁₂ 1,2 μg·L⁻¹.

Columnas de burbujeo

Se utilizaron columnas de burbujeo de 100 L con una altura de 2 m y un diámetro de 25 cm, aireadas con un tubo difusor de poliamida de 5 mm en la parte inferior de la columna (Sánchez Mirón *et al.*, 2000; Sánchez Mirón *et al.*, 2002).

Las columnas se inocularon con 20 L de cultivo producido en botellones de 5 L en laboratorio. Se dejaron crecer hasta llegar a estacionaria temprana, momento en el cual se inició la renovación diaria del 30% de volumen con medio fresco en las primeras horas del día.

Durante los dos primeros días de cultivo del mes de julio se colocó un filtro de poliéster negro en la parte inferior de las columnas durante las horas centrales del día para evitar una posible fotoinhibición.

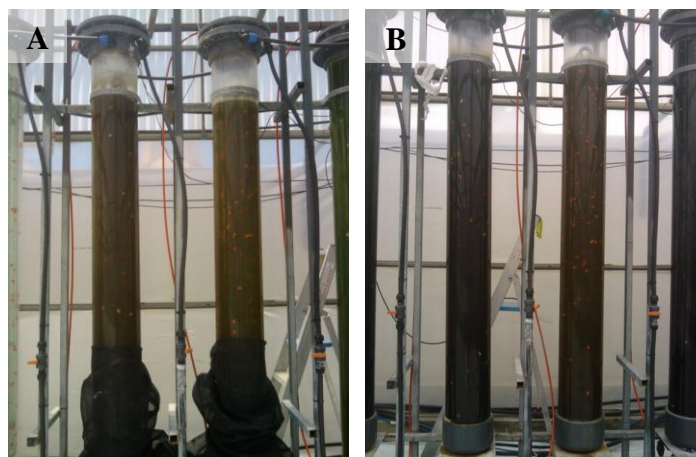


Fig. 6 Columnas de burbujeo de 100 L en E. E. Las Palmerillas con filtro protector (A) y en condiciones normales de trabajo (B)

Bolsas cilíndricas

Se utilizaron bolsas transparentes de polietileno (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2014). Las bolsas cilíndricas tenían un volumen de 400 L y 60 cm de diámetro mientras que las bolsas planas tenían 200 L de capacidad y un paso de luz de 5 cm. Ambos sistemas están soportados por un enrejado metálico y disponen de control de temperatura mediante intercambiador de calor de acero inoxidable y con aireación y posibilidad de suministrar CO₂ a demanda para mantener el pH en 7.8.

Las bolsas cilíndricas y planas se inocularon con 30 L y 15 L de cultivo respectivamente, producido en las columnas de burbujeo. Se dejaron crecer hasta llegar a fase estacionaria temprana, momento en el cual se inició la renovación diaria del 30% de volumen con medio fresco en las primeras horas del día.



Fig. 7 Bolsa cilíndrica de 400 L



Fig. 8 Bolsa plana de 200 L

Fotobiorreactor *airlift* tubular horizontal

El fotobiorreactor tubular horizontal consta de un sistema de tubos transparentes de plexiglás de 10 cm de diámetro conectados con uniones en U y colocados en dos alturas para aumentar la superficie, sin superponerse. El sistema de tubos está conectado a una

columna *airlift* donde se realiza el intercambio de gases y el control de temperatura y que proporciona una velocidad en el tubo de $0,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. El volumen total del sistema es de 4.000 L (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010).

El sistema se inoculó con 100 L de cultivo de una columna de burbujeo y se dejó crecer hasta llegar a estacionaria temprana, momento en el cual se inició la renovación diaria del 30% de volumen con medio fresco en las primeras horas del día.



Fig. 9 Fotobiorreactor tubular horizontal con columna airlift (A) y sistema tubular de captación de luz (B) situado en un invernadero en la E. E. Las Palmerillas (Almería).

Cultivo de rotíferos

El rotífero *Brachionus plicatilis* (O.F. Müller) se cultivó de forma rutinaria en botellones de 5 L con agua de mar de salinidad 3,5%, autoclavada durante 21 minutos a 121°C , sometidos a aireación suave y fotoperiodo circadiano de 12 horas de luz y 12 de oscuridad en la cámara de cultivo a $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Diariamente se alimentaron con biomasa de varias especies de microalgas marinas: *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas lens*, *Microchloropsis gaditana* (conocida anteriormente como *Nannochloropsis gaditana*), *Tisochrysis lutea* y *Phaeodactylum tricornutum*.

12 horas antes de comenzar el experimento los rotíferos se recogieron en una malla de $65 \mu\text{m}$ y se transfirieron a un nuevo botellón con agua de mar estéril sin alimentación.

El experimento de crecimiento de rotíferos se realizó en botellas de borosilicato de 1 L de capacidad. El cultivo se inició con un volumen de 500 mL y una densidad inicial de $50 \text{ rotíferos}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diariamente se alimentaron los rotíferos por la mañana con la ración suministrada el día anterior y se ajustó la ración por la tarde tras realizar los recuentos.



Fig. 10 Sistema de cultivo de rotífero en botella de borosilicato de 1 L de capacidad con aireación suave.

El cálculo de la ración se realizó con base en el trabajo de Patiño (1995) que determinó que 2.000 células de *T. suecica*, equivalentes a 400 ng de microalga por individuo y por día, es suficiente para mantener una tasa de ingestión constante evitando momentos de saciedad seguidos de una disminución de la actividad filtradora. Se calculó la ración en número de células equivalentes en peso, fijándose en 30.000 células de *T. lutea* por individuo y por día. Esta ración fue suficiente para alimentar durante 24 h, evidenciándose con la presencia de células sobrantes.

El recuento de los rotíferos y del número de huevos se realizó a diario con una lupa binocular sobre una placa Petri en la que se depositó 1 mL de cultivo repartido en gotas. Se realizaron tres recuentos de cada réplica.

Recuento celular

El recuento de la densidad celular de los cultivos microalgales se realizó a primera hora de la mañana. Cuando los cultivos estaban en régimen semicontinuo, el recuento se realizó sobre el volumen retirado al renovar, antes de adicionar medio fresco. Se utilizó una cámara de recuento Improved Neubauer (Brand) y un microscopio de contraste de fases Nikon Labophot con un objetivo 40X. Para ello se realizaron diluciones en agua de mar, de forma que el número de células contadas por campo de recuento de 1mm² se encontrase entre 30 y 300 (ICSH, 1988). Se añadieron 20 µL de lugol para fijar las muestras.

Determinación de la viabilidad celular

Se utilizó fluoresceína diacetato (FDA) para tratar las muestras de los concentrados y poder discernir entre células activas y muertas (Gilbert *et al.*, 1992). El fluorocromo FDA es un éster no polar no fluorescente y lipofílico, capaz de difundir libremente por la membrana plasmática. Las células vivas, donde las enzimas esterases están activas, liberarán la fluoresceína, hidrofílica, que ya no será capaz de salir de la célula y emitirá una fluorescencia verde-anaranjada cuando se ilumine con luz ultravioleta (Medzon & Brady, 1969).

Para determinar la actividad esterasa se incubaron suspensiones celulares ($2 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) de 1 mL durante 5 minutos en oscuridad a 20 °C con 10 µL de una solución en acetona de FDA (Sigma F7378) de 20 µg·mL⁻¹ de concentración y se realizaron recuentos de células totales y células con fluorescencia en el verde en un microscopio Olympus BX 50, con objetivo PAN FLUOR 40X para fluorescencia (Day *et al.*, 2007). Se utilizó como control positivo un cultivo de *T. lutea* en fase logarítmica, donde la

viabilidad fue del 100% y como control negativo, un cultivo tratado con microondas donde la viabilidad fue del 0%. La viabilidad se expresó como

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{Número de células post-tratamiento FDA positivas}) / (\text{Número total de células observadas en un campo de visión}) * 100$$

Elaboración de concentrados de microalgas

En laboratorio

Para elaborar los concentrados de la primera parte del Capítulo 3 se utilizó una centrífuga de rotor basculante Kubota KS8000 a 3.100 rpm (2.000 g). Se centrifugaron tubos Falcon con 50 mL de cultivo de densidad conocida y se descartó el sobrenadante. Los pellets se combinaron en un recipiente de polietileno autoclavado y se resuspendieron en agua de mar para obtener una concentración de biomasa de 100 mg·mL⁻¹ (10% p/v) y se preservaron a 4 °C para el seguimiento de su evolución.

Para elaborar los concentrados de la segunda parte del sección 3.1 se utilizó una centrífuga Hettick Universal 32R 9.000 g. Se centrifugaron tubos Falcon con 50 mL de cultivo de densidad conocida y se descartó el sobrenadante. Los pellets se resuspendieron en el propio tubo en agua de mar para obtener una concentración de biomasa de 100 mg·mL⁻¹ (10% p/v) y se preservaron a 4 °C para el seguimiento de su evolución.

Para elaborar los concentrados de la sección 3.2 se utilizó una centrífuga Beckman J2 H2 de 1 L de capacidad con rotor HA 14 a 2.000 g y 9.000 g. Se centrifugó a 4 °C cultivo en recipientes de 250 mL y se descartó el sobrenadante. Los pellets se combinaron en un recipiente de polietileno autoclavado y se resuspendieron en agua de mar para obtener una concentración de biomasa de 100 mg·mL⁻¹, (10% p/v) y se preservaron a 4 °C.

Industrial

Se utilizaron las siguientes centrífugas industriales:

Centrífuga de alimentación continua Westfalia LG205-1 de tambor rotatorio a 6.300 g. Esta centrífuga se alimenta con cultivo (1 L·min⁻¹) cuyas células quedan retenidas mientras el medio se descarta hasta que el recipiente interior se llena y en el medio clarificado se observan células no retenidas. La biomasa concentrada, con un 80% de sólidos, se extrajo manualmente de la cuba de centrifugación.

Se utilizaron también las centrífugas de discos Alfa Laval Clara-20 (11.130 g) y Flottweg AC 2500 (10.000 g), que procesan el cultivo bombeado al interior donde los discos rotatorios expulsan el agua y retienen las células hasta que se llena el espacio entre ellos. La centrífuga Alfa laval se opera con un caudal de entrada de 600-800 L·h⁻¹ y la Flottweg a 3.000 L·h⁻¹.

Recogida de muestras de microalgas a escala de laboratorio

La biomasa microalgal para realizar las analíticas se recogió centrifugando entre 5 y 50 mL de cultivo en una centrífuga de rotor basculante Kubota KS8000 a 3.100 rpm, en tubos de vidrio. Se retiró el sobrenadante y se congelaron los tubos con el pellet a -20 °C.

La biomasa de rotífero se recogió filtrando 100 mL de cultivo, primero a través de una malla de 300 μm para retirar las pseudoheces y después filtrando a través de una malla de 65 μm , lavando con agua destilada y congelando a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Determinación de la concentración de nitrato en el medio de cultivo de microalgas

Se centrifugaron 2 mL de cultivo durante 21 minutos a 3.100 rpm. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C a otro tubo. La concentración de NO_3^- se determinó por espectrofotometría empleando una longitud de onda de 220 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm. Como patrón se utilizaron diluciones de NaNO_3 en agua de mar. Los valores de absorbancia de estas diluciones se ajustaron a una recta por mínimos cuadrados a partir de la cual se interpoló la concentración de nitrato del medio de cultivo (Collos *et al.*, 1999).

Determinación del carbono orgánico total (TOC)

Para determinar la liberación de materia orgánica como indicador de la degradación celular de *T. lutea* durante la elaboración de biomasa concentrada al 10% p/v se cuantificó el TOC en el agua de mar de los concentrados (Bisutti *et al.*, 2004). Se centrifugaron a 9.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos alícuotas de 1 mL de los concentrados y se tomaron muestras de los sobrenadantes resultantes, que se filtraron usando un filtro del 0,45 μm y se preservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. En el caso del concentrado procedente de la centrífuga Westfalia, debido a la consistencia arcillosa, se centrifugó 1 g.

Para la determinación del Carbono Orgánico Total (TOC) se utilizó un analizador TOC-VCPH Shimadzu con autosampler ASI-V. El analizador realiza la medida de carbono total TC por combustión a CO_2 y la medida del carbono inorgánico total TIC por acidificación, utilizando el método 5301B de alta temperatura (Rodger B. Baird, 2017). La detección y cuantificación del CO_2 se realiza mediante infrarrojos no dispersivos (NDIR). El software TOC-Control V (Shimadzu) automáticamente calcula $\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC}$.

Determinación de la resistencia celular a la reconstitución de los concentrados

En los experimentos de evaluación de la calidad de los productos preservados de los capítulos 2 y 3, salvo en el primer experimento de la sección 3.1, se pipetearon alícuotas de 1 mL de concentrado y se reconstituyeron al volumen inicial de cultivo (100 mL) en agua de mar estéril. En los experimentos de determinación del efecto de la congelación y la liofilización se reconstituyó a volumen original en el propio tubo donde se centrifugó y procesó la biomasa.

Se realizaron recuentos en el momento de la reconstitución y pasadas 24 h tras agitar para resuspender las células que se hubieran podido depositar. Estas densidades celulares se compararon con la densidad teórica del cultivo y entre ellas para determinar la degradación celular.

Determinación del mantenimiento en la columna de agua

Se pipetearon alícuotas de 1 mL de concentrado y se reconstituyeron al volumen inicial de cultivo (100 mL) en agua de mar estéril. Se realizaron recuentos en momento de la reconstitución y pasadas 24 h sin agitar, introduciendo la punta de la pipeta hasta la marca

de 90 mL, para determinar el número de células que se depositaron en 24 h. Estas densidades celulares se compararon con la densidad tras agitar.

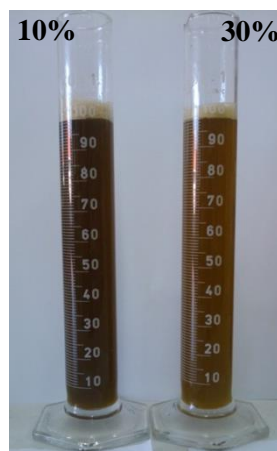


Fig. 11 Concentrados de *T. lutea* cultivada con dos tasas de renovación, 10% y 30%, reconstituidos a densidad original de cultivo para la determinación de permanencia en la columna de agua

Determinación del peso seco

Para la determinación del peso seco de los cultivos, la recogida de microalgas se realizó en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C lavados con agua destilada y secados a 80°C. Se pesaron en una balanza analítica Sartorius modelo 2405 ($d=\pm 0,001$ mg). Se filtraron entre 2 y 5 mL de cultivo y se lavó con una disolución isotónica 0,5 M de formiato de amonio (Utting, 1985). El filtro se secó durante 24 horas a 80 °C y a continuación se pesó en la misma balanza analítica. El peso seco es la diferencia entre el peso del filtro una vez filtrada la muestra y el peso del filtro antes de filtrar. El peso por célula se calcula conociendo el peso del volumen filtrado ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y la densidad del cultivo ($\text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$).

La determinación del peso seco de los rotíferos se realizó recogiendo 100 mL de cultivo de densidad conocida y lavando con agua destilada en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, secados a 80 °C y pesados previamente en una balanza analítica Sartorius modelo 2405 ($d=\pm 0,001$ mg). El filtro se secó durante 24 horas a 80°C y a continuación se pesó en la misma balanza analítica (Zhu & Lee, 1997).

Para la determinación del peso de los concentrados, se centrifugaron entre 15 y 50 mL de biomasa por triplicado en tubos Falcon®, previamente pesados en una balanza de alta precisión Precisa 125 A. Las muestras se centrifugaron a 9.000 rpm en una centrifuga Hettick Universal 32R a 4°C y se congelaron a -20°C para su posterior liofilización en un liofilizador Labconco Lyph-lock 6 durante 24 horas. Tras la liofilización, los tubos Falcon® con la biomasa liofilizada, fueron nuevamente pesados en la misma balanza de alta precisión. El peso seco es la diferencia entre el peso del tubo de Falcon® con la biomasa liofilizada y el peso inicial del tubo de Falcon® vacío.

Análisis elemental (C-H-N)

Los análisis de la composición elemental (Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno, CHN) se realizaron por triplicado sobre alícuotas de la biomasa liofilizada homogenizada. Se pesaron 1-2 mg de muestra en una balanza analógica Sartorius ($d=\pm 0,001$ mg) en una

cápsula especial de estaño. Para la realización de los análisis se utilizó un autoanalizador Flash EA 1112 de Thermo Finnigan.

El método analítico se basa en la oxidación instantánea y completa de la muestra, que convierte todas las sustancias orgánicas e inorgánicas en productos de la combustión. Los gases resultantes de la combustión pasan a través de un horno de reducción y son barridos al interior de la columna cromatográfica (Poapak PQS) por el gas transportador, en este caso helio, donde son separados para su detección por un detector de conductividad térmica que emite una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra. El instrumento se calibra con acetanilida, estándar aconsejado para muestras con alto contenido orgánico, siendo la concentración de las muestras calculada mediante un algoritmo de regresión lineal en el área de los picos generados por el detector. Para la realización de estos cálculos el autoanalizador está equipado con un ordenador (EAGER 300).

Determinación del contenido de proteínas

Para el cálculo del contenido de proteína de la biomasa se utilizó el valor del contenido de N obtenido por análisis elemental (C:H:N). Para ello se utilizó el factor de conversión 5,8 propuesto por Gnaiger y Bitterlich (1984), en sustitución del clásico factor de conversión 6,25 (FAP/WHO, 1973). Se demostró que para diversas muestras de origen marino incluyendo algas, bacterias, protozoos e invertebrados, este factor es más ajustado que el factor 6,25 (Gnaiger & Bitterlich, 1984).

Determinación del contenido total de lípidos.

Para la determinación de lípidos totales se ha utilizado el método estándar de extracción propuesto por Bligh y Dyer (1959). Se realizó un extracto lipídico de 30 mL de cultivo. Las muestras se extrajeron con 30 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 V:V) y se centrifugaron para separar el sobrenadante. Se añadieron al sobrenadante 12 mL cloroformo y 12 mL de agua. Se separaron las fases mediante centrifugación y se transfirió la fase apolar a balones de 150mL previamente secados en una estufa a 60°C durante 24h y pesados en una balanza de alta precisión Precisa 125 A. Se secaron las muestras en un rotavapor Memmert a 40 °C. Tras evaporar el solvente, los balones con la biomasa se secaron en una estufa a 60°C durante 24h y se volvieron a pesar en la balanza Precisa 125 A. El contenido lipídico se calculó mediante la diferencia del peso final e inicial de los tubos sobre el peso de la muestra.

Determinación del contenido de ácidos grasos.

El análisis de ácidos grasos se realiza en dos fases, en primer lugar, una extracción de los lípidos y a continuación una esterificación mediante la cual se obtienen los ésteres metílicos de los ácidos grasos, que son analizados en el cromatógrafo. La extracción lipídica previa de los ácidos grasos se realizó siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959) como se ha descrito anteriormente. Para ello se realizó un extracto lipídico de 5 mL de cultivo fresco de microalga centrifugado (3.000 rpm, 10 min, 4°C). Las muestras se extrajeron con 3 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 V:V) separando la fase polar mediante la acción de 1,8 mL de cloroformo y 1,8 mL de agua. Ambas las fases se separaron por centrifugación y se separó la fase apolar a un nuevo tubo añadiendo 50 μL de una disolución 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de triheptadecanoin (17:0) como estándar interno. Los extractos lipídicos, previa evaporación del cloroformo bajo flujo de nitrógeno, se sometieron a

metanólisis durante 2,5 horas a 85°C mediante la adición de 2 mL de HCl:CH₃OH al 5 % en peso (Sato & Murata, 1988). Los metil ésteres de ácidos grasos así obtenidos se separaron de la fase polar mediante una doble extracción con hexano. El volumen final de hexano se redujo entre 300 y 500 µL para su análisis en un cromatógrafo de gases-espectrofotómetro (GC-MS).

Para la identificación de los ácidos grasos de las muestras se utilizó un cromatógrafo de gases (GC-MS) PerkinElmer 800-8000 Series. Se utilizó una columna Omegawax TM250 fused silica (Supelco) de 30 m – 0,25 mm. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: volumen inyectado, 1 µL; gas portador, He; flujo gas portador en la columna 0,8 mL.min⁻¹; relación splitless, 1:99; temperatura inyector, 230 °C. Método del cromatógrafo: tiempo splitless, 1min; temperatura, 35°C, 1 min; rampa de 35 °C.min⁻¹ hasta 200 °C; 250°C, 55 min. Método de adquisición de espectros de masas: retardo del solvente, 4,5 min; rango masas, 0,50-400; tiempo inter-scan, 30 segundos.

Esta identificación fue confirmada mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos con los tiempos de retención de un patrón comercial de metil-ésteres de ácidos grasos cuantitativo Supelco FAME Mix y un patrón cualitativo Supelco Menhaden Fish Oil. El cálculo de la concentración se realizó mediante la integración del área bajo los picos, que en el sistema GC-MS es directamente proporcional a la masa. Adicionalmente se confirmó la identificación de los picos mediante comparación de los os espectros de masas de la biblioteca de espectros de masas WIST/NBS.

Determinación de bacterias aerobias totales y vibrios

La cuantificación de bacterias y vibrios en los cultivos microalgales y en los concentrados se realizó en placas de Petri estériles con los medios de cultivo de agar tripticasa soja suplementado con NaCl al 1% (TSA-1) y agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS), respectivamente. Tras la realización de diluciones seriadas, se sembraron 100 µL en las placas de agar. Después de 24h en estufa a 25°C se contaron las Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) en las placas de Petri con medio agar TCBS para cuantificación de bacterias del género *Vibrio*. Para la cuantificación de las UFCs en el medio agar TSA-1 se esperó aproximadamente 7 días. En el recuento se tuvo en cuenta que el número de UFCs por placa de petri se encontrase entre 30 y 300 (ICSH, 1988).

Tratamiento estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el software SPSS version 17.0.3 (Chicago, IL). Se aplicó una prueba T de Student para datos pareados, Shapiro-Wilkinson para evaluar la normalidad y una prueba ANOVA con test a posteriori Tukey HSD con un intervalo de confianza del 95%.



Capítulo 1 . OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *T. lutea*

1.1 Estudio del crecimiento de *T. lutea* e *I. galbana* en cultivo semicontinuo con distintas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

Isochrysis galbana Parke y *Tisochrysis lutea*, denominada *Isochrysis* sp. T-ISO o *Isochrysis aff. galbana* Clon T-ISO, se han considerado tradicionalmente como pertenecientes al género *Isochrysis* debido a sus características morfológicas. Sin embargo, tienen procedencias distintas y perfiles bioquímicos y de ácidos grasos diferentes, por lo que recientemente, y tras un análisis comparativo de secuencias de ADN ribosómico y mitocondrial, la cepa conocida como *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO ha sido reclasificada en un nuevo género y especie, *Tisochrysis lutea*, bajo la misma familia Isochrysidaceae (Bendif *et al.*, 2013).

Indistinguibles por microscopía óptica y cultivadas casi indistintamente como alimento en acuicultura, estas dos especies tienen rangos de temperatura de crecimiento distintos, con óptimos referenciados en 22 °C para *I. galbana* (Ewart & Pruder, 1981) y 27 °C para *T. lutea* (Nelson *et al.*, 1992; Renaud *et al.*, 1995; Sayegh *et al.*, 2007; Sayegh & Montagnes, 2011; Thompson *et al.*, 1992). Aunque hay trabajos que comparan estas dos especies a diferentes temperaturas, los datos presentados corresponden a cultivos *batch* de baja densidad, por lo que es necesario corroborar este comportamiento en sistemas de cultivo semicontinuo de altas densidades, más parecidos a las condiciones industriales de producción en fotobioreactores de alto rendimiento, donde las variaciones de la temperatura durante el día y el año son frecuentes y manipular la temperatura es complicado, requiriendo además un gasto energético elevado.

A la hora de optimizar las condiciones de cultivo de una especie cuando se desea escalar a volúmenes industriales, la temperatura es un factor que ha de ser tenido en cuenta, sobre todo en sistemas al aire libre, ya que determinará la productividad y la composición bioquímica de las microalgas, afectando al rendimiento del sistema y a la calidad del producto final. Asimismo, la selección del emplazamiento de las plantas de producción de microalgas exclusivamente en función de la disponibilidad de luz puede ser

contraproducente, ya que se suele corresponder con zonas de temperaturas elevadas (mayores de 30 °C), que se han demostrado deletéreas para la mayoría de las especies comerciales cultivadas en la actualidad (Masojíddek *et al.*, 1999).

Además, la calidad de la microalga suministrada como alimento en acuicultura depende del contenido en proteínas y del perfil de ácidos grasos de éstas. Por lo tanto, y ya que las condiciones de cultivo modifican el perfil bioquímico de las microalgas, es necesario determinar la variación de dicho perfil y del de ácidos grasos con la temperatura para definir el valor nutricional de estas especies cultivadas en distintas condiciones.

El estudio de la variación del perfil de ácidos grasos de *T. lutea* e *I. galbana* con la temperatura ha arrojado resultados contradictorios, probablemente debido al efecto de otros parámetros sobre dicho perfil, encontrando autores que defienden el aumento de la insaturación con el descenso de la temperatura (Renaud *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 1995) y otros que defienden que no existe tal relación (Thompson *et al.*, 1992).

Por estas razones y teniendo en cuenta que el sistema de cultivo empleado en este experimento se asemeja a las condiciones esperables en sistemas industriales, conocer el comportamiento en respuesta a la temperatura de estas dos especies permitirá, en primer lugar, seleccionar aquella que ofrezca mejor respuesta en sistemas de cultivo con los parámetros de cultivo luz y temperatura preestablecidos y, en segundo lugar, permitirá predecir la composición bioquímica de la biomasa producida, como ya se demostró para *Nannochloropsis limnetica* (Freire *et al.*, 2016) y *N. gaditana* (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que *Isochrysis galbana* Parke fue aislada en latitudes septentrionales de aguas frías (Isla de Man, Mar del norte) y que *T. lutea* es una cepa tropical (Tahití, Pacífico Sur), se espera que *I. galbana* presente mejor crecimiento entre los 15 y los 22 °C y *T. lutea*, entre los 22 y los 35 °C, como ya se describió en cultivos *batch* de laboratorio.

La cuota de carbono se supondrá más alta en aquellos cultivos con una densidad de equilibrio menor debido a la mayor disponibilidad de luz por célula.

Se espera que en ambas especies el porcentaje de ácidos grasos insaturados disminuya a favor del porcentaje de saturados con el incremento de la temperatura.

OBJETIVO

Determinar el rango de temperaturas de crecimiento (temperaturas cardinales), la temperatura óptima y el efecto sobre la composición bioquímica de *T. lutea* CCMP 1324 e *I. galbana* CCAP 927/1 en cultivos de alta densidad.

DISEÑO EXPERIMENTAL

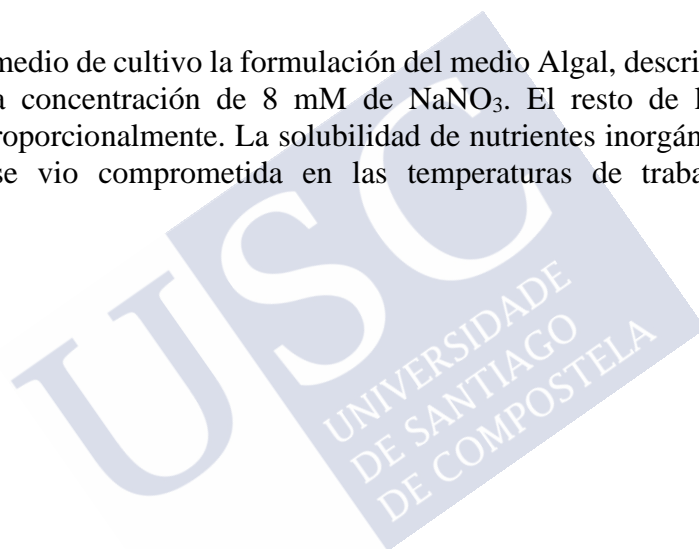
Las microalgas marinas *Isochrysis galbana* CCMP 1323 e *Tisochrysis lutea* (T-ISO) CCMP 1324 se cultivaron en unidades de cultivo tubulares de 80 mL y 30 mm de diámetro sometidos a un régimen de luz:oscuridad 12h:12h, siendo la intensidad luminosa $97,85 \pm 2,15 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se burbujó aire en los cultivos de forma continua, enriqueciendo con CO₂ en pulsos de 10'' cada 10' durante el período de luz para mantener el pH entre 7,6 y 7,8.

Ambas especies se cultivaron a 15 °C, 22 °C, 27 °C y 35 °C. Se seleccionaron estas temperaturas porque a 15 °C se ha descrito crecimiento para *T. lutea*, 22 °C, 27 °C son los óptimos descritos para *I. galbana* y *T. lutea* respectivamente y 35 °C es una temperatura frecuente de trabajo en los sistemas de cultivo exteriores.

El control de la temperatura se realizó sumergiendo los tubos en baños termostatzados. Para mantener el agua a 15 °C se empleó una unidad refrigeradora Frigedor-Reg (Selecta) mientras que para conseguir 22 °C, 27 °C y 35 °C se emplearon calentadores sumergibles regulables Tetra® T01212 (Alemania). Dos veces al día se comprobó el volumen y la temperatura de los baños.

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $7,86 \pm 1,32 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ y se dejaron crecer hasta alcanzar el final de la fase logarítmica, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 30% del volumen. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se recogieron muestras de biomasa para la determinación del peso seco y se centrifugaron y congelaron a -20 °C varias alícuotas de los cultivos para su posterior análisis bioquímico.

Se utilizó como medio de cultivo la formulación del medio Algal, descrito en Fábregas *et al.* (1984) a una concentración de 8 mM de NaNO₃. El resto de los nutrientes se incrementaron proporcionalmente. La solubilidad de nutrientes inorgánicos en el medio de cultivo no se vio comprometida en las temperaturas de trabajo del presente experimento.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperaturas óptimas, subóptimas y letales. Densidades en cultivo *batch* y en equilibrio.

Durante el cultivo *batch* se observa que *I. galbana* alcanza la densidad máxima a 15 °C, alcanzando casi el doble de densidad que a 27 °C ($65,5 \cdot 10^6$ frente a $126,13 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) aunque con poca diferencia con los cultivos a 22 °C ($109,75 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, Fig.1.1.1Fig 1.1A). El cultivo sometido a una temperatura de 35 °C, tras un breve período de crecimiento, se colapsó en el séptimo día. Hay evidencia de que *I. galbana* puede crecer a 10 °C (Roleda *et al.*, 2013) pero no a temperaturas inferiores (Ukeles, 1961) y, aunque Kain & Fogg (1958) y Ukeles (1961) concluyeron que *I. galbana* solo podía crecer hasta los 25 °C con óptimo entre 14 y 22 °C, en el presente experimento sí se observa crecimiento por encima de 25 °C, aunque menor que a 22 °C; esto ya lo observaron Claquin *et al.* (2008), quienes determinaron la temperatura letal para esta especie en torno a 29,1 °C. Igualmente, es probable que pueda soportar temperaturas superiores si la temperatura no fuese constante y descendiese a lo largo del día.

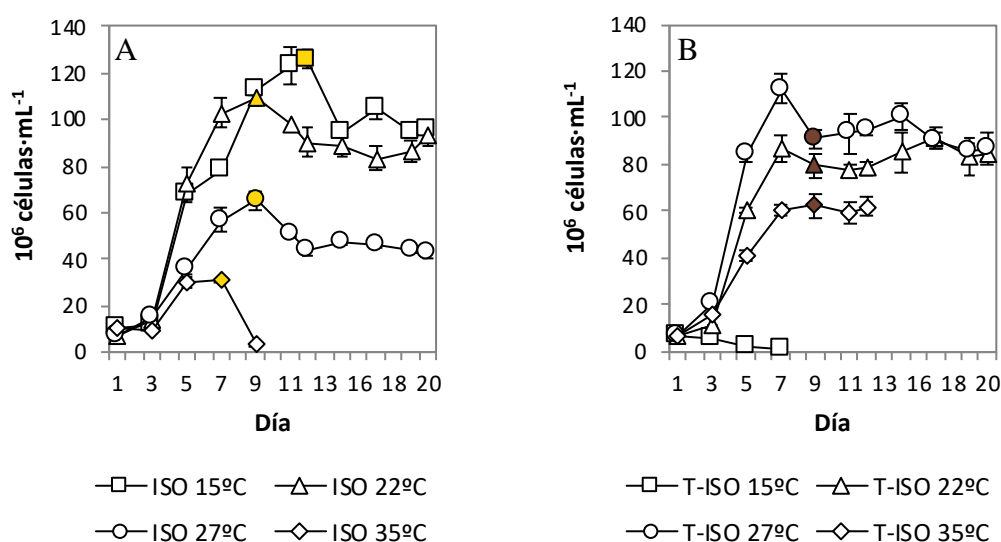


Fig 1.1.1 Evolución de la densidad de *Isochrysis galbana* (A) y *Tisochrysis lutea* (B) cultivadas a distintas temperaturas. El marcador en color indica el día de inicio del cultivo semicontinuo (n=3)

I. galbana en cultivo semicontinuo con una tasa de renovación diaria del 30% produce densidades de equilibrio sin diferencias significativas entre las temperaturas 15°C y 22°C ($98,41 \pm 5,98 \cdot 10^6$ y $87,69 \pm 5,02 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ respectivamente, $p < 0,05$), muy superiores a la obtenida a 27°C ($44,44 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹). Estas densidades de equilibrio son inferiores a las densidades máximas alcanzadas en cultivo *batch* (Fig. 1.1.2A), continuando con la tendencia a descender con el aumento de la temperatura observada en la fase de cultivo *batch* y disminuyendo un 22% a 15 °C, 20% a 22 °C y 32% a 27 °C, con respecto a los valores alcanzados en fase estacionaria. Para esta misma cepa, la densidad de equilibrio en el presente experimento es netamente superior a la obtenida por Seixas *et al.* con esta misma tasa de renovación en botella de 1 L (2008) en botellón de 6 L (2009), con $15,4 \cdot 10^6$ y $22,8 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ respectivamente, probablemente debido

a la menor disponibilidad de luz por célula de estos sistemas de cultivo comparados con los tubos de 3 cm de diámetro del presente experimento.

T. lutea, al contrario que *I. galbana*, en cultivo *batch* alcanza la mayor densidad a 27 °C ($112,33 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) comparado con 22 o 35 °C ($86,73 \cdot 10^6$ y $60,98 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ respectivamente), siendo 15 °C una temperatura letal para esta especie en las condiciones ensayadas. A 35 °C, el cultivo *batch* alcanza la fase estacionaria y parece permitir el cultivo semicontinuo durante 4 días, momento en el cual repentinamente se colapsa Fig. 1.1.1B. Debido a esto, aunque se proporcionan datos de densidad celular y productividad (Fig. 1.1.2B), no se pudieron recoger muestras para análisis bioquímico ni de ácidos grasos.

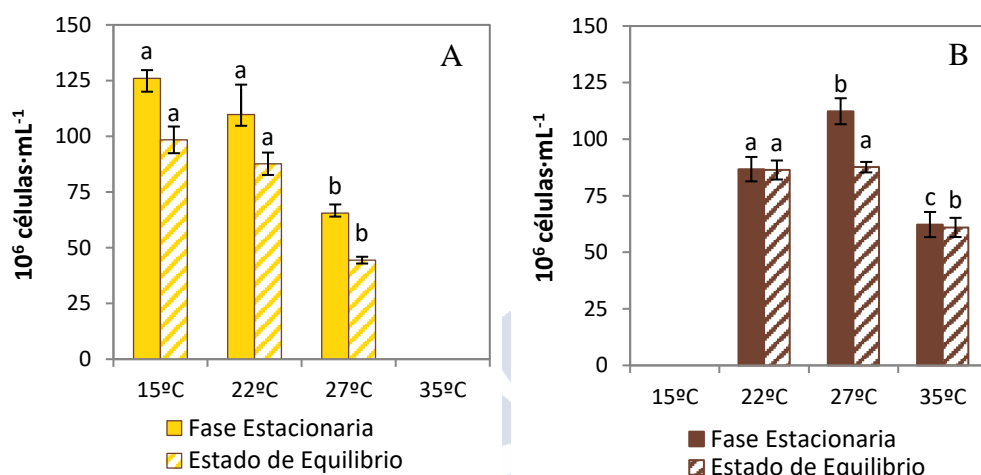


Fig 1.1.2 Densidad máxima alcanzada y densidad en equilibrio de *Isochrysis galbana* (A) y *Tisochrysis lutea* (B) cultivadas a diferentes temperaturas. Cultivo semicontinuo con TR=30% (n=3). Diferentes letras en una temperatura y fase del cultivo indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Estos resultados coinciden con otros ensayos (Lin *et al.*, 2007; Renaud *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 1995; Saoudi-Helis *et al.*, 1994) que determinaron temperaturas letales a 10 y 40 °C y temperatura óptima entre los 20 y los 30 °C para esta especie. Sin embargo, Thomson *et al.* (1992), trabajando con la cepa NECC#601, consiguieron crecimiento a 10 y 15 °C, con $220 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura que se observó letal en el presente experimento. Sayegh & Montagnes (2011) también observaron crecimiento a 15 °C. En este sentido Sorokin & Krauss (1962) y Vonshak (2000) encontraron que las microalgas pueden presentar fotoinhibición, incluso a intensidades luminosas bajas, debido a la presencia de otros factores de estrés, como temperaturas subóptimas. Concretamente en *Chlorella sorokiniana*, con una temperatura óptima de crecimiento en 38 °C, cuando se comparó con un cultivo a 20 °C con la misma intensidad luminosa se observó fotoinhibición en la temperatura subóptima de 20 °C (Cuaresma Franco *et al.*, 2012). Este efecto negativo de temperaturas subóptimas sobre el crecimiento, cuando van acompañadas de altas intensidades luminosas, podría explicar el éxito de cultivo a 15 °C en los experimentos de Thomson *et al.* (1992) y Sayegh & Montagnes (2011), ya que la luz efectiva por célula es inferior a la suministrada en el presente experimento debido a que los sistemas de cultivo tienen una menor relación superficie/volumen.

Carvalho *et al.*, (2009) también observaron un efecto sinérgico entre luz y temperatura para *Pavlova lutheri* cultivada entre los 10 y los 26 °C con distintas intensidades luminosas. Sin embargo, debido a que comparan las dos variables en un cultivo *batch* y la densidad varía con el tiempo, es difícil cuantificar el efecto real de las variables sobre

la tasa de crecimiento. Esto no ocurre con el cultivo semicontinuo, donde la tasa de crecimiento está fijada por la tasa de renovación, pudiéndose determinar el efecto de la temperatura sobre la densidad de equilibrio y donde, llegado este punto, la luz por célula será constante en el tiempo.

En cuanto al límite máximo de temperatura, aunque en el presente experimento no fue posible cultivar *T. lutea* a más de 27°C, algunos autores reportan crecimiento a 33 °C (Yang & Hur, 2012) y 35 °C (Claquin *et al.*, 2008). Probablemente a partir de 30 °C los cultivos sean más sensibles a variaciones en otros parámetros, por lo que serán inestables, pero, si la temperatura no se mantuviese constantemente por encima de los 30 °C y/o la irradiancia fuese menor, es posible que *T. lutea* soportase esas temperaturas es cultivos en el exterior.

Para las temperaturas que permitieron alcanzar el equilibrio una vez establecido el cultivo semicontinuo, la densidad de *T. lutea* a 22 °C no presenta diferencias con la densidad máxima en cultivo *batch* ($86,36 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $86,73 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹). Sin embargo, a 27 °C la densidad de equilibrio es un 22% menor a la densidad en fase estacionaria ($87,62 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹), no habiendo diferencias en las densidades de equilibrio entre las temperaturas 22 °C y 27 °C. A 35 °C tampoco hay diferencias entre la densidad máxima alcanzada y la densidad de equilibrio antes del colapso ($62,55 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $60,98 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) ($p < 0,05$; Fig. 1.1.2B).

Las diferencias en la densidad de equilibrio a distintas temperaturas pueden deberse al inferior rendimiento de los aparatos enzimáticos de las células cuando éstas se cultivan fuera de su óptimo de funcionamiento. Las células han de dedicar más recursos a sintetizar enzimas catalizadoras de las reacciones químicas celulares. Al incrementarse los requerimientos nutricionales por célula, la cantidad de células que puede sostener un cultivo es menor y, por lo tanto, las tasas de crecimiento y densidades máximas en cultivo *batch*, así como la densidad de estabilización en cultivo semicontinuo (Raven & Geider, 1988).

La cuantificación de NaNO₃ disponible en los cultivos semicontinuos una vez alcanzado el estado de equilibrio reveló que en ninguno de los casos se consumió todo el nitrógeno disponible (entre 2,6 y 3,8 mM de N residual); esto sugiere que, en los cultivos en temperatura óptima, la limitación del crecimiento se debió a otro nutriente diferente al nitrógeno o a que estos cultivos están limitados por luz.

Peso celular y composición bioquímica en cultivos semicontinuos

La temperatura, al determinar la densidad de equilibrio, modifica la luz efectiva disponible por célula. Las diferencias observadas en la densidad de equilibrio están correlacionadas inversamente con las diferencias en el peso celular ($r^2=0,999$ para *T. lutea* y $r^2=0,997$ para *I. galbana*). Aquellos cultivos que alcanzan una densidad de equilibrio mayor presentan los pesos celulares más bajos, cercanos a 12 pg·célula⁻¹ para *I. galbana* (Fig. 1.1.3).

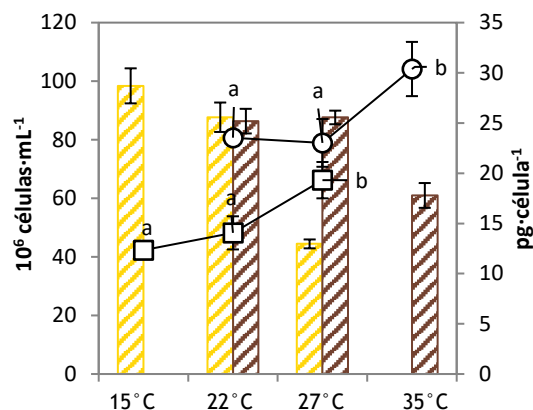


Fig 1.1.3 Comparación del peso celular (marcadores) con la densidad celular en el estado de equilibrio (barras) de *I. galbana* (amarillo) y *T. lutea* (marrón) cultivadas a distintas temperaturas con tasa de renovación del 30% (n=3). Diferentes letras en una temperatura y microalga indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

El incremento de la temperatura causó un incremento del peso celular en ambas especies. En el caso de *T. lutea*, a las temperaturas de 22 y 27 °C se obtiene un peso celular de 23 $\text{pg} \cdot \text{célula}^{-1}$ (Figura 1.1.3). Seixas *et al.* (2008) cultivando *T. lutea* a 22°C en sistemas de 1 L con una luz efectiva por célula inferior al presente experimento, determinó el peso celular de *T. lutea* en $30 \pm 2,8 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$, similar al obtenido a 35 °C, a pesar de que la densidad a 35 °C en el presente experimento es tres veces la obtenida por Seixas *et al.*, (2008). Esto podría deberse a que la menor disponibilidad de luz por célula en el sistema de 1 L conlleva una densidad de equilibrio muy inferior ($20,8 \pm 2,3 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a $60,98 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ en el sistema tubular utilizado en el presente experimento) con un incremento en la disponibilidad de nutrientes, que permiten el incremento del tamaño. Para condiciones de cultivo casi idénticas al cultivo a 22 °C (Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*, 2008), pero que permitieron una densidad de estabilización menor ($60 \cdot 10^6$ frente a $92 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$), el peso seco obtenido fue de $14,49 \pm 0,86 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$, inferior al obtenido en el presente experimento ($23,54 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$). Esto puede deberse a que en dicho experimento se utilizó una concentración de 4 mM de KNO_3 (frente a 8 mM de NaNO_3 del presente experimento). Esto conduce a productividades superiores a Ferreira tanto en células $\cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ($18,17 \cdot 10^9$ frente a $25,91 \cdot 10^9$) como en peso ($263 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ frente a valores comprendidos entre los 609,98 y 565 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, Fig. 1.1.4).

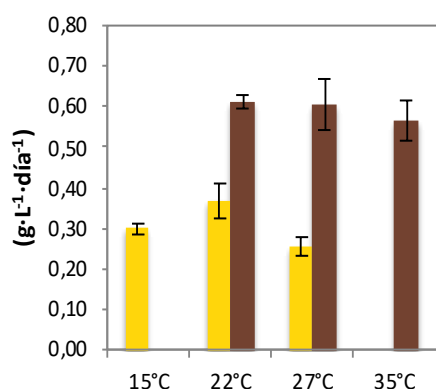


Fig 1.1.4 Productividad de *I. galbana* (barras amarillas) y *T. lutea* (barras marrones) cultivadas a distintas temperaturas con tasa de renovación del 30% (n=3)

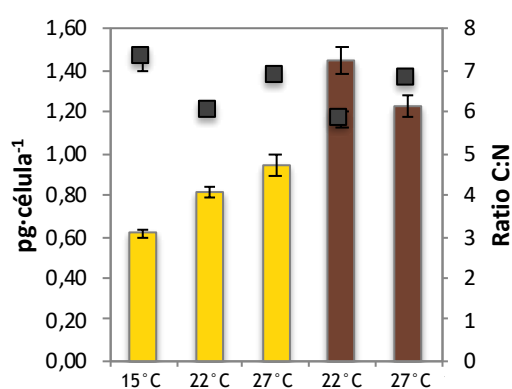


Fig 1.1.5 Cuota celular de nitrógeno Q_N (barras) y relación C:N (marcadores) de cultivos de *I. galbana* (amarillo) y *T. lutea* (marrón) cultivadas a distintas temperaturas con TR30% (n=3).

Cultivar ambas especies por debajo o por encima de su temperatura óptima no afecta a la productividad en biomasa debido a que el incremento de peso por célula que experimentaron las microalgas cultivadas a temperaturas no óptimas compensa la menor densidad de equilibrio. Sin embargo, *T. lutea* es casi el doble de productiva en peso que *I. galbana* ($0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ frente a valores entre $0,26$ y $0,37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$) a cualquier temperatura, a pesar de que las densidades de equilibrio son similares.

El incremento de peso en aquellos cultivos que alcanzan una menor densidad de equilibrio, sometidos a temperaturas fuera del óptimo, pero saturados de nutrientes y sin limitación de luz, se explicaría por la utilización de la fijación de carbono como sumidero de poder reductor fotosintético. Este incremento en la síntesis de componentes celulares se ve reflejado en el incremento en el peso celular y, como veremos posteriormente, en las fracciones de lípidos de reserva y glúcidos. Este patrón ya se ha observado en *T. lutea* (Chen *et al.*, 2012b), donde el peso seco es menor en la temperatura que produce máxima tasa de crecimiento, a 25°C , aunque los pesos citados en este estudio, (en torno a $40 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$), son muy superiores a los obtenidos en el presente estudio ($23,02 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$).

La relación C:N en *I. galbana*, a pesar de que el nitrógeno no es limitante, no obedece a un patrón debido a que la incorporación de C y N no es proporcional con el aumento de la temperatura (Fig. 1.1.5). A 15°C , donde la densidad de equilibrio es máxima y el peso celular es mínimo, la relación C:N es máxima (7,30), debido a un menor contenido en proteína ($3,56 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$ frente a $4,73$ y $5,47 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$ a 22°C y 27°C respectivamente) y mayor contenido de la fracción que contiene los glúcidos que a 22°C ($5,02$ y $4,41 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$), incorporando más N en condiciones de temperatura superiores al óptimo de 15°C .

De hecho, en *I. galbana* la proteína se incrementa con la temperatura, de $3,56$ a $5,47 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$, siendo inversamente proporcional a la densidad celular, como también lo hace la fracción lipídica ($3,76$ - $5,36 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$, Fig. 1.1.6 A). Esto se debe probablemente a una mayor disponibilidad de luz y nutrientes por célula, al ser las densidades de estabilización inferiores, reflejándose a su vez en la relación C:N.

Un patrón similar se ha encontrado en *Skeletonema costatum*, donde se observa que, con el descenso de la tasa de crecimiento al aumentar la temperatura, el contenido de proteína y el tamaño celular aumentan (Jørgensen, 1968).

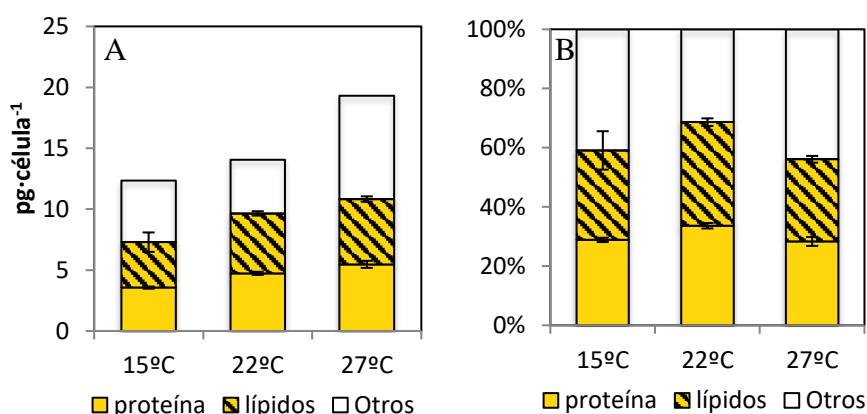


Fig 1.1.6 Contenido celular (A) y porcentaje (B) de proteína, lípidos y otros de peso seco *I. galbana* cultivadas a distintas temperaturas con tasa de renovación del 30% (n=3).

En *I. galbana* cuando se observa la evolución de los porcentajes de cada fracción orgánica con la temperatura (Tabla 1.1.1, Fig. 1.1.6B), debido a que la incorporación de nitrógeno y carbono no es proporcional, el nitrógeno se dirige mayoritariamente a la producción de proteínas y el carbono puede encontrarse en lípidos o glúcidos dependiendo de otros parámetros del cultivo, como la luz. Por ello, el porcentaje de proteína se mantiene constante (en torno al 30%) en todos los casos, pero el porcentaje de lípidos desciende con el incremento de la temperatura (y la disminución de la densidad de equilibrio) y el porcentaje de glúcidos es máximo cuando la densidad es la menor.

En el caso de *T. lutea*, debido al colapso repentino del cultivo a 35 °C, no se disponen de datos de composición bioquímica a esa temperatura. Aunque no hay diferencias en la densidad de estabilización entre los cultivos a 22 y 27 °C se observa un descenso del contenido de proteína con el aumento de la temperatura (8,39 frente a 7,9 pg·célula⁻¹, Fig. 1.1.7A) y porcentaje de proteína (35,65% frente a 30,82%) (Tabla 1.1.1, Fig. 1.1.7B). No hay diferencias en el contenido de lípidos y glúcidos entre las dos temperaturas ni en el porcentaje de la fracción que contiene de glúcidos, aunque, en el caso de los lípidos, con el incremento de la temperatura aumenta el porcentaje (15,41% frente a 21,6%).

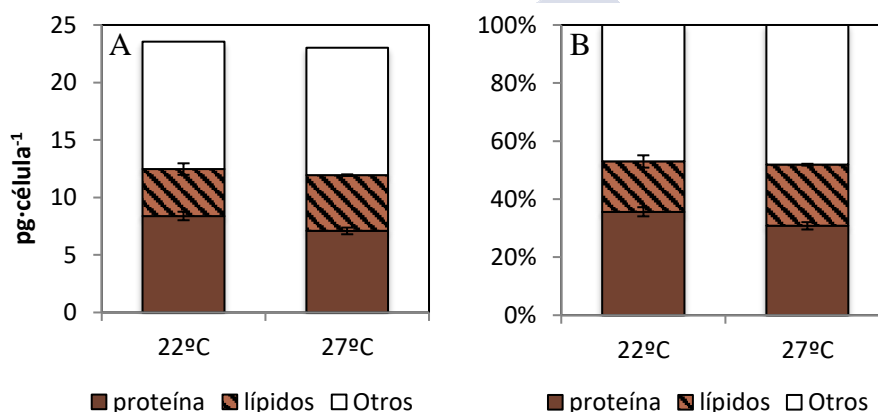


Fig 1.1.7 Contenido celular (A) y porcentaje (B) de proteína, lípidos y otros de peso seco de *T. lutea* cultivada a diferentes temperaturas con tasa de renovación del 30% (n=3). Los cultivos a 35 °C no se pudieron analizar por colapso repentino de los cultivos.

El descenso del contenido de lípidos con el incremento de la luz efectiva por célula observado en ambas especies concuerda con los datos obtenidos para *T. lutea* por Brown *et al.*, (1993). Igualmente se encuentra un mayor porcentaje de lípidos en los cultivos que tienen mayor crecimiento, esto es a 20 °C (29,6%) frente a las cultivadas a 15 °C (7-8%). Thompson *et al.*, (1992) también observaron un incremento de los glúcidos y los lípidos con el aumento de la temperatura. Sin embargo, Renaud *et al.*, (2002) observaron un descenso del porcentaje de proteína con el incremento de la temperatura para *T. lutea* y no encuentran relación entre la temperatura y el perfil bioquímico, observando un incremento de los carbohidratos a 27 °C. Además, estos autores reportaron que el peso seco es más alto con el incremento de la tasa de crecimiento. Estas contradicciones se pueden explicar teniendo en cuenta que para ese experimento no se empleó CO₂ y el pH era alto, limitando así el crecimiento y la incorporación de carbono.

En otras especies se observa que las temperaturas subóptimas o por encima del óptimo promueven la acumulación de lípidos. Esto es así en *Scenedesmus* sp. (Xin *et al.*, 2011), en *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* (Converti *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente experimento parecen demostrar que la variación en la composición bioquímica observada se debe la interacción de las dos variables: luz y temperatura. La temperatura actúa de forma indirecta, limitando la densidad de equilibrio en valores subóptimos y, por lo tanto, variando la luz disponible por célula, que sería la verdadera responsable de la variación en la composición bioquímica.

Perfil de ácidos grasos

En lo que respecta al perfil de ácidos grasos de *I. galbana*, se produce un descenso en el porcentaje de ácidos grasos saturados con el incremento de la temperatura, con un incremento simultáneo de los poliinsaturados (Figura 1.1.8 A)

El 14:0 sufre un descenso dramático con el incremento de la temperatura de 26,45% a 9,20% y el 16:0 aumenta ligeramente de 18,81 a 21,17% (Figura 1.1.9A).

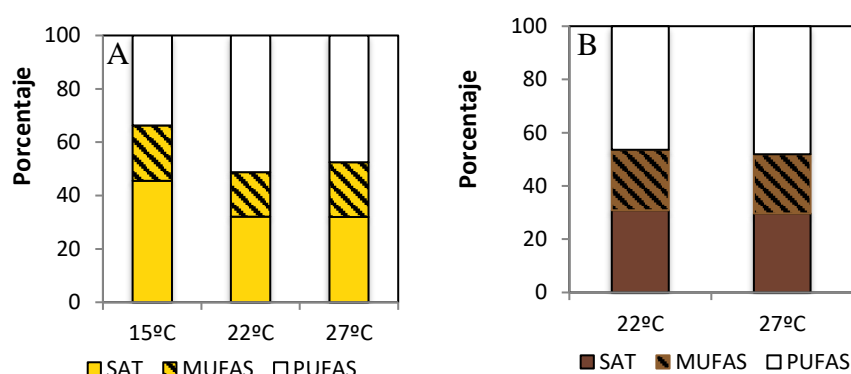


Fig 1.1.8 Porcentaje ácidos grasos Saturados, Monoinsaturados y Poliinsaturados de *I. galbana* (A) y *T. lutea* (B) cultivadas a distintas temperaturas en cultivo semicontinuo con una tasa de renovación del 30% (n=3). Los cultivos a 35°C de *T. lutea* no se pudieron analizar por colapso repentino de los cultivos.

El 18:1n9 parece elongarse a EPA y DHA a temperaturas mayores a 15 °C, descendiendo de 14,86% a menos del 2%, a 22°C independientemente de la densidad de equilibrio, que es similar a estas dos temperaturas. Este ácido graso generalmente está en lípidos de reserva (triacilglicéridos), que aumentan en condiciones como menor densidad de estabilización por haber mayor luz disponible (Suknik & Wahnnon, 1991), circunstancia contraria a lo que acontece en el presente experimento.

Aunque los PUFAs aumentan con el incremento de la temperatura, este fenómeno se observa solamente en el EPA y DHA ya que 18:3n3 y 18:4n3 disminuyen con el aumento de la temperatura (de 15% a 5,49% en el caso del 18:4n3). El EPA entre los 15 y los 22 °C aumenta drásticamente (de 1,48% a 23,81%), disminuyendo ligeramente hasta 18,74% a 27 °C. Los porcentajes de ácidos grasos a 22 °C concuerdan con los reportados por Seixas *et al.*, (2008) que también cultivó *I. galbana* con una tasa de renovación del 30%.

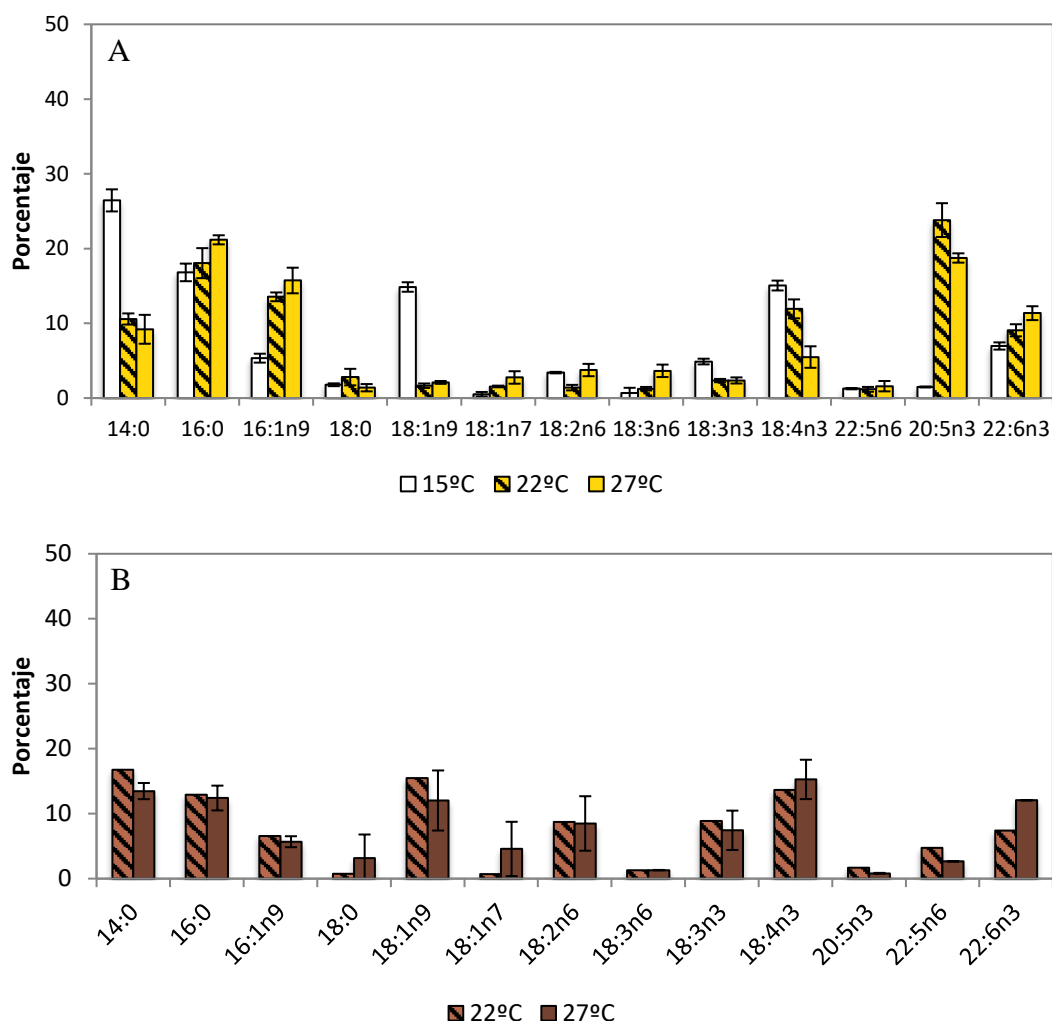


Fig.1.1.9 Perfil de ácidos grasos de *I. galbana* (A) *T. lutea* (B) cultivada a distintas temperaturas en cultivo semicontinuo con una tasa de renovación del 30% (n=3).

El hecho de que el 18:4n3 sólo descienda un 3% entre los 15 y los 22°C y se desplome a un 5,49% a 27°C sugiere que este ácido graso, presente mayoritariamente en galactolípidos asociados a las membranas tilacoidales (Meireles *et al.*, 2003; Sukenik & Wahnon, 1991), desciende en concentración cuando la luz por célula aumenta, independientemente de la temperatura.

El abrupto incremento del EPA entre los 15 y los 22°C, temperaturas a las cuales no hay diferencias significativas en las densidades de equilibrio, sugiere un mecanismo de regulación de la síntesis de EPA afectado por la temperatura, e influenciado minoritariamente por la luz en esta especie. En el caso del DHA, éste aumenta de forma constante con la temperatura independientemente de la densidad de equilibrio (y por tanto de la luz efectiva por célula). Aunque otros autores asocian abundancia de DHA con mayores intensidades luminosas (Ferreira *et al.*, 2008; Tzovenis *et al.*, 1997), en este caso sólo explicaría el incremento de DHA de 22 a 27°C, pero no el que ocurre de 15 a 22°C, sugiriendo que la temperatura tiene mayor impacto en el DHA que la luz.

La tendencia a aumentar los PUFAS con el aumento de la temperatura difiere de lo reportado previamente (Renaud *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 1995; Roleda *et al.*, 2013) para *I. galbana*, probablemente debido a otros factores implicados como la luz.

Al contrario que en *I. galbana*, en *T. lutea* no hay diferencias en los porcentajes de las distintas fracciones de ácidos grasos salvo en el caso del DHA (Figura 1.1.9B), lo que sugiere que las células no tienen la necesidad de hacer variar la fluidez de las membranas y la luz efectiva por célula es la misma ya que no hay diferencias en la densidad celular en estado de equilibrio entre los 22 y los 27°C (Figura 1.1.2). El perfil de ácidos grasos a 22 °C es similar al obtenido por Ferreira *et al.*, (2008) cultivando en las mismas condiciones.

Aunque en *T. lutea* el porcentaje de PUFAS no varía con el incremento de la temperatura, al contrario que en *I. galbana*, el EPA y el 22:5n6 descienden con el incremento de la temperatura hasta la mitad. El 18:4n3 y el DHA aumentan (de 7,41% al 12,06% para este último), observándose que en la temperatura óptima de cultivo se favorece la elongación y desaturación a expensas del EPA y del 22:5n6 (Figura 1.1.9B). Igual que en *I. galbana*, parece que la síntesis DHA está influenciada por la temperatura y no por la luz.

Este efecto también se observa en los monoinsaturados. El 18:1n7 a 27 °C, que es muy superior al observado a 22 °C (4,57% frente a 0,72%) a expensas del 16:1n9 y 18:1n9, que están presentes en menor porcentaje a 22 °C.

Aunque el nivel de insaturación ha sido propuesto como el mecanismo para mantener la fluidez de las membranas (Harwood, 1988; Sargent *et al.*, 1989), ésta también puede regularse con la longitud de la cadena de los ácidos grasos, así como la cantidad de colesterol (Hochachka & Somero, 1984). En microalgas, encontramos resultados contradictorios que no permiten discernir claramente un patrón de respuesta a la temperatura.

El análisis de ácidos grasos de otra primnesiofícea, *Diacronema vlkianum*, reveló que el porcentaje de PUFAS es mayor a 18 °C que a 26 °C (39,48% frente a 30,27%) (Durmaz *et al.*, 2009) al contrario de lo encontrado en el presente experimento. Sin embargo, este incremento del porcentaje de PUFAS puede deberse a que esta especie tiene mayor tasa de crecimiento y alcanzó una mayor densidad a 18 °C, disponiendo de menor cantidad de luz efectiva por célula, incrementándose la síntesis de membrana tilacoidal para aumentar la capacidad de captación de luz y, por lo tanto, incrementándose la síntesis de ácidos grasos de membrana, típicamente PUFAS.

Adlerstein *et al.* (1997) achacan los cambios en el perfil de ácidos grasos con la temperatura entre 20 y 30°C a una modificación de la luz efectiva disponible y al estado nutricional de las células en *Porphyridium cruentum*.

Para esta misma especie, Durmaz *et al.* (2007) encontraron en cultivos diluidos diariamente para mantener la concentración de clorofila constante, que la temperatura modifica la cantidad de EPA. En cultivos mantenidos a temperatura subóptima de 20 °C y menos luz efectiva por célula, presentan mayor proporción de EPA. Sin embargo, cuando la temperatura es óptima (25 °C), aquellos cultivos con más luz efectiva por célula presentaban mayores cantidades de EPA. Este efecto puede deberse a que las tasas de crecimiento en cultivos con más luz son mayores y las células son más jóvenes que los que presentan una dilución menor o quizá que en temperaturas subóptimas se disminuye el aparato fotosintético.

Estudios con especies de microalgas cultivadas en *batch* evidencian que hay un incremento de la concentración de PUFAS con el descenso de la temperatura: tanto en *Phaedactylum tricornutum* (Dodson *et al.*, 2013; Jiang & Gao, 2004) como e

Porphyridium cruentum (Durmaz *et al.*, 2007), *Diakronema vlkianum* (Durmaz *et al.*, 2009) y *Chlorella vulgaris* (Hu *et al.*, 2008). Igualmente, varios estudios determinan que las bajas temperaturas incrementan la expresión de los genes para las enzimas desaturasas, como las implicadas en la síntesis de DHA, en *Pavlova salina* (Zhou *et al.*, 2007) y las responsables de desaturación en posición $\omega-3$ en la microalga antártica *Chlamydomonas* sp. (An *et al.*, 2013). Nuestros resultados demuestran que las conclusiones derivadas de cultivos *batch* deben ser evaluadas con precaución ya que, en cultivos continuos con tasa de crecimiento constante, el efecto puede ser el contrario.

Teoh *et al.* (2004) observaron en *Chlorella*, con similar tasa de crecimiento, que los PUFAS se incrementan con el aumento de la temperatura. Especies con la misma tasa de crecimiento en un amplio rango de temperaturas, como aquellas del género *Nannochloropsis* o *Chlorella* sp. (James *et al.*, 1989), podrían ser útiles para estudiar la variación del perfil de ácidos grasos con la variación de la temperatura sin influencia de la variación dependiente de la intensidad luminosa.



Tabla 1.1.1 Productividad y composición de *Isochrysis galbana* y *Tisochrysis lutea* cultivadas en régimen semicontinuo (TR diaria 30%) a distintas temperaturas (n=3).

	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323					<i>Tisochrysis lutea</i> CCMP1324 (T-ISO)				
	15°C	22°C	27°C	22°C	27°C	22°C	27°C	35°C		
Fase estacionaria										
10 ⁶ células·mL ⁻¹	126 ± 3,71	109,75 ± 13,45	65,5 ± 3,93	86,73 ± 5,40	112,33 ± 5,75	62,55 ± 5,56				
Dens. equilibrio										
10 ⁶ células·mL ⁻¹	98,41 ^a ± 5,98	87,69 ^a ± 5,02	44,44 ^b ± 1,52	86,36 ^a ± 4,20	87,62 ^a ± 2,32	60,98 ^b ± 4,24				
Peso celular										
pg·célula ⁻¹	12,34 ^a ± 0,06	14,06 ^a ± 1,65	19,31 ^b ± 1,81	23,54 ^a ± 0,60	23,02 ^a ± 2,38	30,38 ^b ± 2,70				
Productividad										
10 ⁹ células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	29,53 ± 1,79	26,31 ± 1,51	13,33 ± 0,46	25,91 ± 1,26	26,29 ± 0,70	18,6 ± 1,27				
mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹	364,31 ± 2,53	369,86 ± 2,49	257,52 ± 0,82	609,98 ± 0,76	605,02 ± 1,66	565 ± 3,49				
Proteína										
pg·célula ⁻¹	3,56 ^{a,b} ± 0,09	4,73 ^a ± 0,13	5,47 ^{a,b} ± 0,29	8,39 ^a ± 0,37	7,09 ^b ± 0,29	-				
Lípidos										
pg·célula ⁻¹	3,76 ^a ± 0,80	4,92 ^b ± 0,18	5,36 ^c ± 0,22	4,08 ^a ± 0,49	4,85 ^a ± 1,35	-				
Otros										
pg·célula ⁻¹	5,02 ± 0,89	4,41 ± 0,31	8,48 ± 0,51	11,07 ± 0,86	11,08 ± 1,64	-				
% Proteína	28,88 ^a ± 0,75	33,64 ^b ± 0,89	28,3 ^a ± 1,48	35,65 ^a ± 1,57	30,82 ^b ± 1,27	-				
% Lípidos	30,27 ^a ± 2,52	34,98 ^b ± 1,29	27,03 ^c ± 3,38	15,41 ^a ± 3,65	21,6 ^a ± 1,89	-				
% Otros	40,85 ± 3,27	31,38 ± 2,18	44,67 ± 4,86	48,94 ± 5,22	47,58 ± 3,16	-				
Q _C										
pg·célula ⁻¹	5,23 ± 0,09	5,72 ± 0,16	7,62 ± 0,43	9,82 ± 0,09	9,66 ± 0,44	-				
Q _N										
pg·célula ⁻¹	0,61 ^{a,b,c} ± 0,02	0,82 ^{a,b} ± 0,02	0,94 ^{a,c} ± 0,05	1,45 ^a ± 0,06	1,22 ^b ± 0,05	-				
C:N	7,30 ± 0,29	6,01 ± 0,03	6,86 ± 0,13	5,82 ± 0,20	6,77 ± 0,06	-				

Tabla 1.1.2 Composición de ácidos grasos de *Isochrysis galbana* y *Tisochrysis lutea* cultivadas en régimen semicontinuo (TR diaria 30%) a distintas temperaturas, expresada en porcentajes sobre el total de ácidos grasos y contenido en pg·célula⁻¹std (n=3 excepto *T. lutea* a 22 °C, donde n=1)

Ácido graso	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323						<i>Tisochrysis lutea</i> CCMP1324 (T-ISO)					
	15°C			22°C			27°C			22°C		
	Porcentaje	pg·cél ⁻¹	Porcentaje	pg·cél ⁻¹	Porcentaje	pg·cél ⁻¹	Porcentaje	pg·cél ⁻¹	Porcentaje	pg·cél ⁻¹	Porcentaje	pg·cél ⁻¹
14:0	26,45 ±1,48	0,43 ±0,06	10,58 0,75	0,32 ±0,04	9,20 1,93	0,20 ±0,01	16,75 0,40	0,21 0,00	13,48 ±1,25	0,19 ±0,04	13,48 ±1,25	0,19 ±0,04
15:0	0,53 ±0,28	0,01 ±0,01	0,59 0,20	0,02 ±0,01	0,19 0,13	0,00 ±0,00	0,40 12,91	0,00 0,16	0,65 ±0,25	0,01 ±0,00	0,65 ±0,25	0,01 ±0,00
16:0	16,81 ±1,18	0,28 ±0,04	18,05 2,01	0,54 ±0,08	21,17 0,61	0,46 ±0,05	12,91 6,57	0,16 0,08	12,41 ±1,91	0,17 ±0,00	12,41 ±1,91	0,17 ±0,00
16:1ω9	5,34 ±0,60	0,09 ±0,01	13,54 0,59	0,41 ±0,03	15,73 1,72	0,34 ±0,01	6,57 0,76	0,08 0,01	5,69 ±0,84	0,08 ±0,02	5,69 ±0,84	0,08 ±0,02
18:0	1,78 ±0,19	0,03 ±0,00	2,81 1,10	0,08 ±0,04	1,38 0,49	0,03 ±0,01	0,76 15,47	0,01 0,01	3,14 ±3,66	0,04 ±0,05	3,14 ±3,66	0,04 ±0,05
18:1ω9	14,86 ±0,64	0,25 ±0,03	1,65 0,30	0,05 ±0,01	2,09 0,19	0,05 ±0,01	15,47 0,72	0,01 0,19	12,03 ±4,63	0,17 ±0,04	12,03 ±4,63	0,17 ±0,04
18:1ω7	0,52 ±0,30	0,01 ±0,00	1,55 0,11	0,05 ±0,00	2,75 0,83	0,06 ±0,03	0,72 8,71	0,19 0,11	4,57 ±4,18	0,07 ±0,07	4,57 ±4,18	0,07 ±0,07
18:2ω6	3,40 ±0,10	0,06 ±0,00	1,40 0,37	0,04 ±0,01	3,75 0,83	0,08 ±0,03	8,71 1,31	0,11 0,02	8,49 ±4,20	0,12 ±0,08	8,49 ±4,20	0,12 ±0,08
18:3ω6	0,67 ±0,71	0,01 ±0,01	1,25 0,24	0,04 ±0,01	3,65 0,83	0,08 ±0,03	1,31 8,90	0,02 0,11	1,31 ±0,03	0,02 ±0,00	1,31 ±0,03	0,02 ±0,00
18:3ω3	4,88 ±0,38	0,08 ±0,00	2,34 0,22	0,07 ±0,00	2,36 0,41	0,05 ±0,02	8,90 13,68	0,11 0,17	7,44 ±3,03	0,11 ±0,06	7,44 ±3,03	0,11 ±0,06
18:4ω3	15,05 ±0,66	0,25 ±0,00	11,93 1,27	0,36 ±0,02	5,49 1,44	0,12 ±0,05	13,68 -	0,17 -	15,27 ±2,28	0,21 ±0,00	15,27 ±2,28	0,21 ±0,00
20:4ω3	-	-	0,27 ±0,09	0,01 ±0,00	0,55 ±0,21	0,01 ±0,01	-	-	-	-	-	-

20:5 ω 3	1,48 ±0,06	0,02 ±0,00	23,81 ±2,26	0,71 ±0,04	18,74 ±0,62	0,41 ±0,04	1,68	0,02	0,82	0,01
22:5 ω 6	1,26 ±0,08	0,02 ±0,00	1,17 ±0,32	0,03 ±0,01	1,59 ±0,70	0,04 0,02	4,73	0,06	2,66	0,04
22:6 ω 3	6,97 ±0,48	0,11 ±0,00	9,07 ±0,81	0,27 ±0,01	11,36 ±0,93	0,25 0,01	7,41	0,09	12,06	0,17
TOTAL	100	1,65 ±0,17	100	3,00 ±0,32	100	2,18 ±0,34	100	1,22	100	1,41 ±0,38
Saturados	45,57 ±3,12	0,76 ±0,11	32,03 ±4,06	0,96 ±0,16	31,95 3,16	0,69 ±0,08	30,82	0,38	29,68	0,41
Monoinsaturados	20,72 ±1,53	0,35 ±0,04	16,75 ±1,00	0,50 ±0,05	20,57 2,74	0,45 ±0,05	22,76	0,28	22,28	0,32
Polinsaturados	33,72 ±2,48	0,55 ±0,02	50,96 ±5,48	1,53 ±0,10	46,92 ±5,75	1,03 ±0,20	46,42	0,55	48,04	0,67
Total ω 3	28,39 ±1,59	0,46 ±0,01	47,15 4,55	1,41 ±0,08	37,94 3,40	0,83 ±0,12	31,67	0,37	35,59	0,49
Total ω 6	5,33 ±0,89	0,09 ±0,02	3,81 ±0,93	0,11 ±0,03	8,98 ±2,35	0,20 ±0,08	14,75	0,18	12,45	0,18
ω 3/ ω 6	5,33	5,00	12,37	12,35	4,22	4,15	2,15	2,03	2,86	2,73
PUFAS/SAT	0,45		0,52		0,64		0,74		0,75	





1.2 Optimización del medio de cultivo para *T. lutea*.

INTRODUCCIÓN

T. lutea se cultiva con éxito en medios convencionales como Algal, Walne o f/2, entre otros muchos (Herrero *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2000) atendiendo a los requerimientos nutricionales básicos que comprenden de una fuente de nitrógeno, fósforo, hierro, metales traza y vitaminas.

Sin embargo, al tratarse de medios generales que permiten cultivar prácticamente todas las especies de interés en acuicultura, no se ha prestado especial atención al impacto que pueden tener las distintas moléculas disponibles para cada elemento requerido, así como al perfil de metales traza, usándose indistintamente nitrato de calcio, sodio o potasio, así como añadiendo al medio de cultivo metales que pueden no ser necesarios o incluso perjudiciales.

Además, en los medios de cultivo para microalgas marinas generalmente no se incluyen minerales como el magnesio o el calcio, ya que se estima que las cantidades presentes en el agua de mar pueden cubrir el requerimiento de éstas. Sin embargo, estos medios se han ensayado en sistemas que generan densidades celulares bajas por lo que actualmente, al trabajar en cultivos ultradensos, pudiera ser que alguno de estos elementos resultase limitante. Este tipo de estudios ha permitido la mejora significativa del rendimiento de algunas especies, como es el caso de (Fábregas *et al.*, 2000) (Fábregas *et al.*, 2000). El medio Conwy, muy extendido en acuicultura, además contiene boro, no presente en el medio f/2 o en el Algal. Asimismo, la composición de micronutrientes es muy variable entre medios de cultivo. Por lo tanto, es interesante explorar el impacto de los distintos elementos disponibles en la productividad de *T. lutea*.

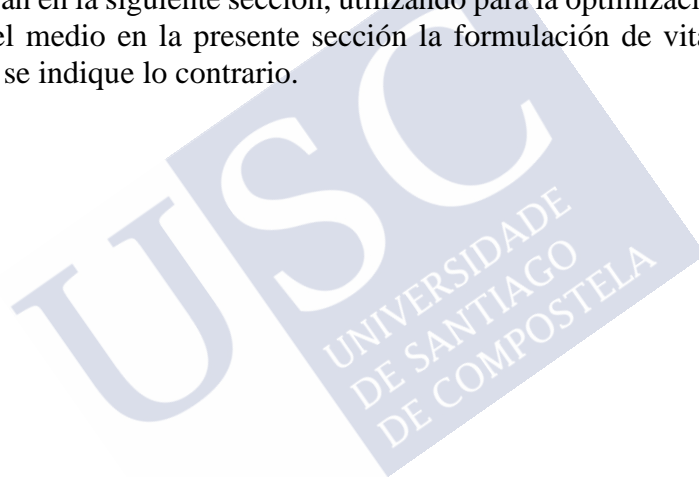
Igualmente, no se ha realizado la comparación de los distintos cationes disponibles en las sales de nitrato, calcio, sodio o potasio, que se usan indistintamente. En nuestro laboratorio hemos observado que, en igualdad de condiciones de cultivo, las microalgas cultivadas con medio Algal con KNO₃ como fuente de nitrato parecen alcanzar densidades inferiores a las cultivadas con medio que incorpora NaNO₃. Roopnarain *et al.*, determinaron que no hay diferencias significativas entre cultivar *I. galbana* con NaNO₃ o KNO₃ en *batch* (2014) pero no hay estudios en semicontinuo y la mayoría de los ensayos publicados que estudian la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo se centran en comparar el efecto de una fuente de nitrato con otras fuentes de nitrógeno como Fidalgo *et al.*, (1998), que estudiaron en *I. galbana* las diferencias producidas en crecimiento y composición bioquímica entre nitrato, nitrito y amonio o Fábregas *et al.* (1989) que estudiaron la respuesta de *Dunaliella tertiolecta* a su cultivo con nitrato, nitrito y urea, así como a diferentes sales de amonio (1989). Por esta razón, y como preparación a la producción industrial que utiliza otra fuente de nitrato no estudiada, el Ca(NO₃)₂, se realizó un experimento para comprobar el efecto de la fuente de nitrato sobre el crecimiento de *T. lutea*.

El empleo de fertilizantes agrícolas para cultivo de microalgas abarata los costes de producción debido al bajo precio de estos y simplifica la preparación de medio de cultivo (Acién Fernández *et al.*, 2012). Los fertilizantes se han ensayado con éxito y se utilizan de forma rutinaria para el cultivo de muchas especies de microalgas (Camacho-

Rodríguez *et al.*, 2013; Fábregas *et al.*, 1987; Pacheco-Vega & Sanchez-Saavedra, 2009; Simental & Sanchez-Saavedra, 2003; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2005), incluyendo *T. lutea*, donde a escala de laboratorio no se observaron diferencias en crecimiento y composición bioquímica entre los cultivos con medio de cultivo tradicional f/2 y fertilizantes (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999).

Sin embargo, otros estudios realizados con la prymnesiofita *Pavlova salina* no han arrojado resultados positivos en la sustitución del medio de cultivo convencional por un fertilizante (Barakoni *et al.*, 2015). Por ello, en vista de que parte de los experimentos para el presente trabajo se iban a realizar en fotobiorreactores de alta capacidad con un fertilizante agrícola empleado rutinariamente para cultivar otras microalgas, es necesario comprobar que éste es adecuado para *T. lutea*.

Los fertilizantes agrícolas disponibles no incluyen en su formulación las vitaminas empleadas en los medios de cultivo para microalgas. Su adición a escala industrial complica la preparación de medio ya que no pueden ser esterilizadas con los métodos habituales (cloración, ozonización...), que eliminan moléculas orgánicas. Además, estas moléculas encarecen el precio final del medio. Los requerimientos de vitaminas de *T. lutea* se estudiarán en la siguiente sección, utilizando para la optimización del resto de los componentes del medio en la presente sección la formulación de vitaminas del medio Algal salvo que se indique lo contrario.



OBJETIVOS

- Mejorar el medio de cultivo Algal mediante el incremento de la concentración de elementos potencialmente limitantes y/o la adición de elementos no presentes en el medio de cultivo (Mg, Ca, B, Se, Cr) para el cultivo de *T. lutea*.
- Determinar la viabilidad del uso de fertilizantes agrícolas para el cultivo de *T. lutea*.
- Descartar variabilidad en los resultados de crecimiento dependiendo de la fuente de nitrato utilizada.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La microalga marina *Tisochrysis lutea* T-ISO CCMP 1324 se cultivó en unidades de cultivo tubulares de 80 mL a 22 ± 1 °C sometidos a un régimen de luz:oscuridad 12h:12h, siendo la intensidad luminosa $185 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se burbujeó aire en los cultivos de forma continua, enriqueciendo con CO_2 en pulsos de 10'' cada 10' durante el período de luz para mantener el pH entre 7,6 y 7,8.

Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 30% del volumen.

Mejora del medio de cultivo Algal

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $4,93 \pm 0,19 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹.

Se utilizó como control la formulación del medio Algal (Fábregas *et al.*, 1984) a una concentración 8 mM de NaNO_3 . El medio Algal se enriqueció con los macronutrientes calcio y magnesio y los micronutrientes boro, cromo y selenio. Además, se incrementó la concentración de los demás micronutrientes y vitaminas según la Tabla 1.2.1

Para simplificar la formulación de los medios de cultivo, se utilizaron las soluciones disp(Fábregas *et al.*, 2000) (Fábregas *et al.*, 2000) salvo la fuente de nitrato y fosfato.

1. Control: Algal 8 mM de nitrógeno
2. Algal + Solución D sin vitaminas añade Cr_2O_3 y SeO_2 e incrementa las concentraciones de citrato de hierro, las sales de cobalto, cobre, manganeso y molibdeno (sin incrementar la concentración de vitaminas).
3. Algal + Solución D añade Cr_2O_3 y SeO_2 e incrementa las concentraciones de citrato de hierro, las sales de cobalto, cobre, manganeso y molibdeno y las vitaminas.
4. Algal + OHM incluye $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y la solución D.
5. Algal + OHM + B, igual a la anterior, añade H_3BO_3 .

Tabla 1.2.1 Formulaciones de los distintos medios de cultivo modificados para complementar los nutrientes presentes en el medio Algal

	1 Algal	2 Algal+(D s/vit)	3 Algal+D	4 Algal+OHM	5 Algal+OHM+B
mM					
NaNO ₃	8	8	8	8	8
KH ₂ PO ₄	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	2	2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	-	1,5	1,5
μM					
C ₆ H ₅ FeO ₇ ·5H ₂ O	80	97,8	97,8	97,8	97,8
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
Cr ₂ O ₃	-	1	1	1	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4	14	14	14	14
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4	5	5	5	5
SeO ₂	-	0,1	0,1	0,1	0,1
ZnCl ₂	4	4	4	4	4
H ₃ BO ₃	-	-	-	-	0,62
EDTA-Na	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8
mg·L⁻¹					
Tiamina	0,14	0,14	0,18	0,18	0,18
Biotina	0,02	0,02	0,07	0,07	0,07
B ₁₂	0,012	0,012	0,042	0,042	0,042

Cultivo con fertilizantes agrícolas

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $7,47 \pm 0,37 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹.

Se utilizó como base la formulación del medio de cultivo utilizado en la estación Experimental Las Palmerillas que posteriormente se utilizaría en los cultivos industriales (Tabla 1.2.2) y se comparó con el control habitual, Algal 8 mM.

Los abonos están compuestos de una o dos fuentes de nitrógeno, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y una solución líquida de microelementos Welgro Hydroponics (Massó Agro, España), todos proporcionados por la Estación Experimental “Las Palmerillas”.

- “Ca” indica que la fuente de nitrógeno es nitrato de calcio
- “Na” indica que la fuente de nitrógeno es nitrato de sodio
- “Ca/Na” indica el empleo de ambas fuentes de nitrato con ratio de contribución 3:2
- “Na analítico” utiliza NaNO₃ de grado analítico, siendo el resto de sales, fertilizantes.
- Solución D implica el enriquecimiento con los oligoelementos del medio OHM
- Adición de Fe implica el enriquecimiento con un quelato de hierro comercial, proporcionado por la E.E. “Las Palmerillas”.

- Todos los abonos incluyen las vitaminas en la concentración indicada en el medio OHM, salvo el que indica “s/vit”, diseñado para estudiar su requerimiento.

Tabla 1.2.2 Comparación de la composición elemental de los medios de cultivo para *T. lutea*

	1	2	3, 4, 5, 6	7	8
	Algal	Abono s/vit	Abonos Ca, Na, Na analítico y Ca/Na	Abono Ca/Na+Fe	Abono Ca/Na+sol D
mM					
N	8	13,84	13,84	13,84	13,84
P	0,4	2,21	2,21	2,21	2,21
Mg	-	3,01	3,01	3,01	3,01
Ca	-	5,09	5,09	5,09	5,09
S	0,2	1,46	1,46	1,46	1,46
B		0,03	0,03	0,03	0,03
μM					
Fe	80	16,12	16,12	25,02	25,02
Co	0,4	-	-	-	0,05
Cu	0,2	0,80	0,80	0,80	0,85
Cr	-	-	-	-	0,50
Mn	4	5,85	5,85	5,85	10,85
Mo	4	0,82	0,82	0,82	1,32
Se	-	-	-	-	0,05
Zn	4	5,73	5,73	5,73	5,73
mg·L⁻¹					
B ₁	0,14	-	0,025	0,025	0,025
B ₇	0,02	-	0,015	0,015	0,015
B ₁₂	0,012	-	0,0061	0,0061	0,0061

Comparación de las fuentes de Nitrato

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $16,54 \pm 0,19 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹. Esta densidad es 4 veces superior a la obtenida en el experimento de mejora de medio de cultivo y aproximadamente 2 veces superior a la obtenida en la prueba de fertilizantes agrícolas. Esto se debe a que se decidió iniciar el experimento con el mismo volumen de inóculo en todas las pruebas (8 mL, 10% del volumen final).

Se utilizó como base el medio de cultivo Algal a una concentración de N de 8 mM con Ca(NO₃)₂·4H₂O, NaNO₃ o KNO₃ como fuente de nitrógeno.

Una vez alcanzado el *steady state* se recogieron muestras de biomasa para determinación de peso seco y se centrifugaron y congelaron a -20 °C alícuotas de los cultivos para su posterior análisis bioquímico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mejora del medio de cultivo Algal

En la fase de cultivo *batch* no se observan diferencias en la densidad alcanzada entre los distintos medios de cultivo probados, que se sitúa en torno a $96 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹.

Al iniciar la renovación diaria del 30% del medio de cultivo, los medios enriquecidos produjeron un incremento en la densidad a más de $120 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, sugiriendo que algún nutriente presente en esos medios y no en el control era limitante. Sin embargo, la densidad de estos cultivos según avanza la etapa de cultivo semicontinuo alcanza el equilibrio a igual o inferior densidad que el control (Fig. 1.2.1).

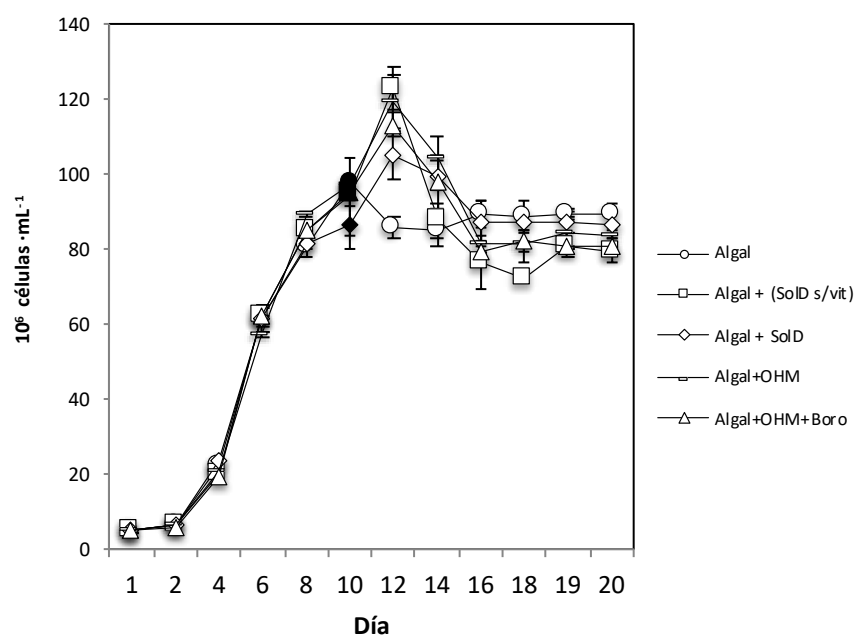


Fig. 1.2.1 Evolución de la densidad de *T. lutea* con diferentes medios de cultivo. El marcador en negro indica el inicio del cultivo semicontinuo (TR diaria del 30%, n=3)

El medio de cultivo Algal es el que mejor resultado de crecimiento permite a *Tisochrysis lutea* en cultivo semicontinuo alcanzándose $89,32 \pm 0,37 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹. Presenta diferencias significativas ($p < 0,05$, Fig. 1.2.1) con los medios Algal+(SolD s/vit) y Algal+OHM+B siendo la densidad obtenida en el control un 17,43% y 10,77% mejor que esos medios, respectivamente (Fig. 1.2.2). De esta forma, añadir boro, magnesio, calcio, selenio y cromo, así como incrementar la concentración de los elementos ya presentes en el medio no mejora la densidad. Además, la presencia de nitrógeno residual en el medio de cultivo indica que los cultivos se vieron limitados por un factor distinto al nitrógeno, que pudiera ser la luz, el fosfato o un elemento traza presente en el agua de mar, ya que en los distintos medios de cultivo se incrementó la concentración de todos los demás elementos, presentes en el Algal.

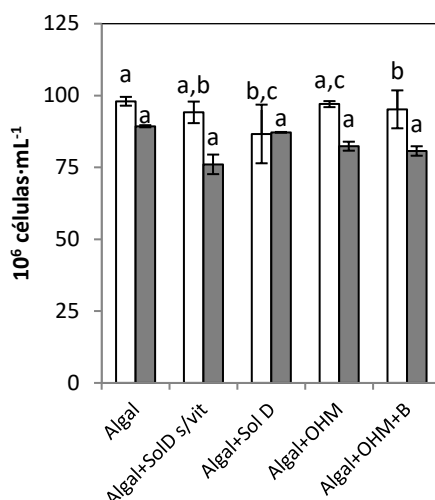


Fig. 1.2.2 Densidad en fase estacionaria (barras blancas) y en estado de equilibrio (barras grises) de *T. lutea* cultivada con diferentes medios de cultivo. (TR diaria del 30%, n=3).

Las densidades obtenidas son netamente superiores a las reportadas por Ferreira *et al.* (2008), que reporta $60 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ para iguales condiciones de luz, temperatura y tasa de renovación. Esto puede deberse al uso de KNO₃ 4mM como fuente de nitrato en el medio de cultivo en lugar de NaNO₃ utilizado en este trabajo. Para confirmarlo, se realizó un experimento de comparación de fuentes de nitrato cuyos resultados se describen al final de esta sección.

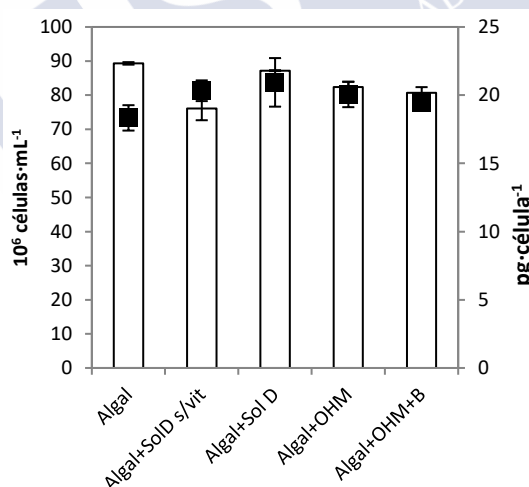


Fig. 1.2.3 Peso celular (puntos) y productividad en peso seco (barras) de *T. lutea* cultivada con distintos medios de cultivo (TR diaria del 30%, n=3). Diferentes letras en una fase del cultivo indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

El cultivo control presenta el peso celular más bajo de todos los cultivos ensayados ($18,34$ pg·cél⁻¹), aunque no se observan diferencias significativas entre los pesos celulares obtenidos ($p > 0,05$, Fig. 1.2.3, Tabla 1.2.4) y por lo tanto las productividades en peso son similares, en torno a $0,5$ g·L⁻¹ día⁻¹.

Cultivo de *T. lutea* con fertilizantes agrícolas

El medio Algal (1) y los abonos Ca (3), Ca/Na+Fe (7) y Ca/Na+Sol D (8) producen densidades celulares más altas en cultivo *batch*, en torno a $86 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹. *T. lutea*

cultivada con abonos Ca/Na (6) y Na (4) alcanzan densidades 10,77% y 28,1% menores respectivamente. La sustitución en el abono del nitrato de sodio comercial por nitrato de sodio de grado analítico produce un descenso en la densidad celular a $49,13 \pm 3,19 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹. El resultado de densidad más bajo se obtuvo al cultivar con el abono sin vitaminas (2), que solo permitió un crecimiento de $29,7 \pm 0,85 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ (Fig. 1.2.4, Fig. 1.2.5).

Estos resultados sugieren que la fuente de nitrato afecta al crecimiento de *T. lutea* y que las concentraciones de nutrientes del Algal son suficientes para alcanzar el máximo crecimiento, así como que la adición de Mg, Ca, B o Se no mejora los resultados. Sin embargo, las vitaminas parecen ser limitantes.

Al iniciar la renovación diaria del 30% del volumen se observa un incremento inicial de la densidad en todos los medios de cultivo, al igual que ocurre en el experimento de mejora del medio Algal, que puede deberse a algún nutriente limitante que se añade con la renovación o a la eliminación de una sustancia tóxica o autoinhibitoria.

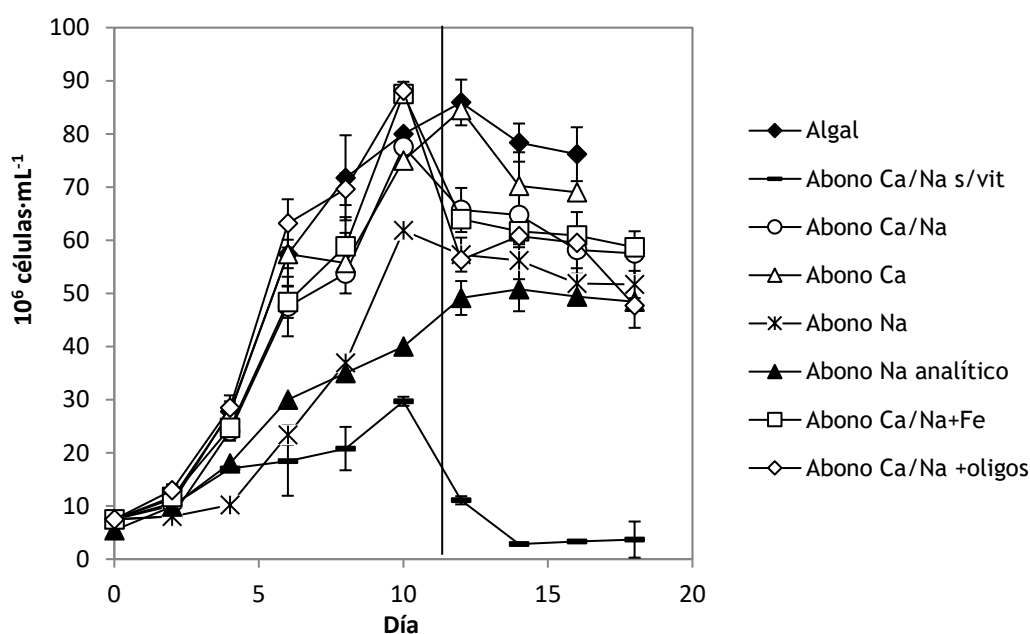


Fig. 1.2.4 Evolución de la densidad de *T. lutea* con distintos fertilizantes agrícolas. La línea marca el inicio del cultivo semicontinuo (TR diaria del 30%, n=3).

Una vez en estado de equilibrio, el medio de cultivo Algal permite alcanzar la mayor densidad de todos los medios ensayados durante el cultivo semicontinuo (Figura 1.2.4, Figura 1.2.5). El empleo del abono diseñado en la E. E. Las Palmerillas, que presenta una mezcla de nitratos de calcio y sodio (Ca/Na), permitió el crecimiento de *T. lutea* aunque con rendimiento menor que el medio control ($60,16 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ frente a $77,28 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹). Esto pudiera deberse a la ausencia de cobalto (más allá del disponible en la vitamina B₁₂) o a la menor cantidad de hierro, molibdeno y/o vitaminas presentes en el abono Tabla 1.2.1). Sin embargo, la adición de hierro al abono (Grupo Ca/Na+Fe) no mejora los resultados en la fase de cultivo semicontinuo, no habiendo diferencias significativas entre este grupo y el abono Ca/Na ($p > 0,05$, Fig. 1.2.5). Igualmente, no hay diferencias entre estos dos medios y el abono que incrementa los elementos traza (Ca/Na+Sol D). Si bien este último medio no iguala las concentraciones de hierro y molibdeno, el incremento en la concentración de estos dos elementos sí debería rendir en

una densidad de equilibrio superior a la alcanzada con el abono base Ca/Na si resultasen limitantes.

Un día antes de acabar el experimento, y estando los cultivos en estado de equilibrio, los sistemas de cultivo del grupo control y del grupo Abono Ca sufrieron un accidente y los cultivos se perdieron, por lo que no se presetan datos de densidad del último día de cultivo.

Los únicos elementos de estas formulaciones de abono que no se equiparan al medio Algal son las vitaminas, que se encuentran en menor concentración (Tabla 1.2.2) pudiendo ser éstas las causantes de una menor densidad de equilibrio. De hecho, con el medio sin vitaminas se consiguió muy bajo crecimiento en *batch* y se produjo el lavado del cultivo en semicontinuo. Las vitaminas son componentes imprescindibles del medio de cultivo para *T. lutea*, tal y como se observa cuando se cultiva en un medio sin vitaminas (Ca/Na s/vit). Durante la fase de cultivo *batch*, el crecimiento es muy inferior al obtenido con los medios que sí incluyen vitaminas, probablemente a expensas de las concentraciones residuales presentes en el medio y de la microbiota acompañante que produce pequeñas cantidades. Una vez iniciado el cultivo semicontinuo, la densidad decrece drásticamente. Un análisis más extenso del efecto de las vitaminas se realiza en la sección 1.3.

Se observa, sin embargo, que la fuente de nitrato presente en el abono arroja resultados de crecimiento diferentes. Los cultivos realizados con abono con nitrato de calcio como fuente de nitrógeno se estabilizan en $69,63 \cdot 10^6 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a los $60,16 \cdot 10^6 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ alcanzados con el abono compuesto por ambas fuentes de nitrato o los $53,24 \cdot 10^6 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ del abono con nitrato de sodio, siendo estas diferencias significativas ($p < 0,05$, Fig. 1.2.5).

La ausencia de diferencias entre el abono con nitrato de sodio industrial y el abono con nitrato de sodio de grado analítico ($p > 0,05$) indica que aquello que mejora el rendimiento de los cultivos con nitrato de calcio deriva de la fuente de nitrato de calcio. Es poco probable que el efecto positivo del nitrato de calcio se deba al ion calcio, ya que de ser así se habría observado en el experimento anterior, donde el enriquecimiento del medio Algal con OHM incrementaba la concentración de calcio sin observarse diferencias significativas con el control. Se debería tratar, por tanto, de alguna impureza u oligoelemento presente en el compuesto.

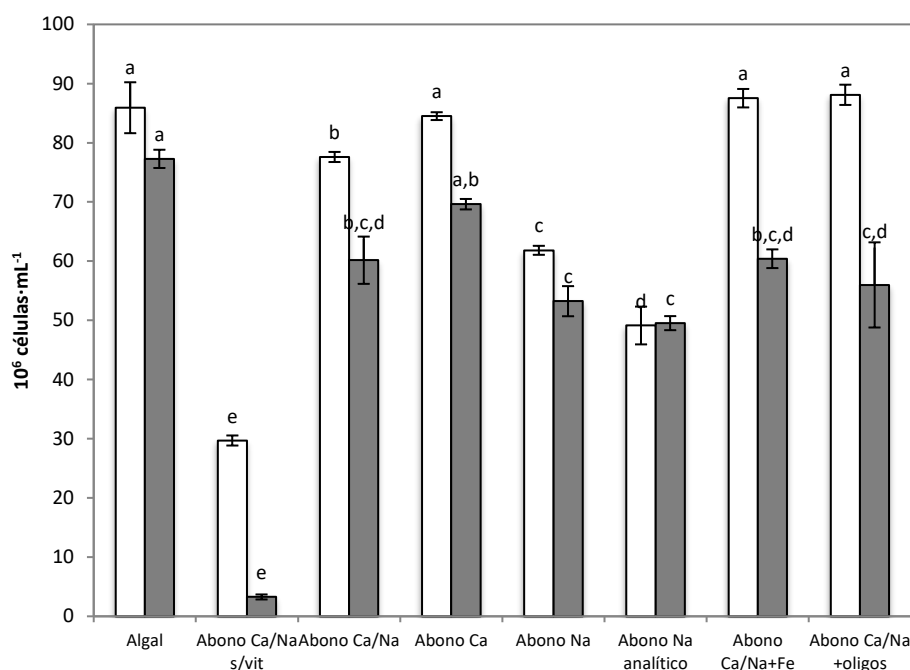


Fig. 1.2.5 Densidad en fase estacionaria temprana (barras blancas) y en estado de equilibrio (barras grises) de *T. lutea* cultivada con diferentes fertilizantes agrícolas (TR diaria del 30%, n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos en una fase del cultivo ($p < 0,05$).

T. lutea se ha cultivado con éxito con fertilizantes industriales produciendo idénticos resultados que el medio f/2 en matraces de 150 mL ($6,36 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹), matraces *Fernbatch* (en torno a $2,92 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹) y sistemas de 18 L (en torno $5,18 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹) (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999) aunque, al ser en cultivo *batch* y con densidades un orden de magnitud más bajas que las obtenidas en el presente trabajo derivadas de la baja concentración de nitrógeno del medio f/2 (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999), las diferencias entre ambos medios pueden no haberse revelado, como ocurre en el presente experimento. El fertilizante empleado por otros autores carece de cobalto y molibdeno sin afectar al crecimiento, como también se observa en el presente experimento.

La ausencia de crecimiento de otra primnesiofícea, *Pavlova salina*, cuando se cultivó con fertilizantes agrícolas que imitaban la composición del medio f/2 puede deberse a que se omitió la adición de vitaminas, que sí estaban en el medio tradicional y que parecen ser imprescindibles en el cultivo de este grupo de microalgas (Barakoni *et al.*, 2015).

Efecto de la fuente de Nitrato

En vista de las diferencias de crecimiento observadas en el experimento anterior con las distintas fuentes de nitrato, se realizó un experimento en el que se comparó el crecimiento de *T. lutea* en cultivos con distintas fuentes de nitrato, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 y KNO_3 , en el medio de cultivo, con el mismo número de moles de nitrógeno (8 átomos-mg), por lo que la concentración molar de NaNO_3 y KNO_3 fue de 8 mM y la de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ fue de 4 mM.

Durante la fase de cultivo *batch* no se aprecian diferencias significativas entre las fuentes de nitrato empleadas para cultivar *T. lutea* (en torno a $110,07 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹, $p > 0,05$, Fig. 1.2.6). Estas densidades son ligeramente superiores a las obtenidas en experimentos donde el control está sometido a las mismas condiciones de cultivo ($98 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ en

el experimento previo de mejora del medio de cultivo y $96,73 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ en el experimento de la sección 1.1 de cultivo a diferentes temperaturas). Las ligeras diferencias pueden deberse a que en el presente experimento la densidad inicial fue sensiblemente más alta ($16,54 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ frente a densidades inferiores a $10 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ en los anteriores experimentos), que permitió un aumento rápido de la densidad sin fase *lag*. Estos resultados coinciden con los observados por Roopnarain *et al.*, (2014) que no observó diferencias significativas cultivando *I. galbana* con NaNO₃ o KNO₃ en *batch*. Fidalgo *et al.*, (1998) observaron que tampoco hay diferencias en las tasas de crecimiento de *I. galbana* cuando se cultiva en *batch* con nitrato nítrico o urea, pudiendo estos resultados conducir a la elección de la fuente de nitrógeno en función de otros parámetros distintos a la productividad, como la disponibilidad o el precio.

Sin embargo, una vez iniciado el cultivo semicontinuo se observa que los cultivos en medio Algal con nitrato de calcio o nitrato de sodio evolucionan mejor, alcanzándose la mayor densidad de equilibrio, que es un 25% superior a la alcanzada por los cultivos en Algal con KNO₃ (Fig.1.2.6). Los cultivos se encontraban saturados de nitrógeno en todos los casos, descartándose una limitación por nutrientes. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de comparar el efecto de cualquier variable sobre el crecimiento de las microalgas en la fase de cultivo semicontinuo, ya que se revelan deficiencias que pudieran pasar desapercibidas en la fase de cultivo *batch*. Las densidades obtenidas por Ferreira (2006) en la *batch* y semicontinuo ($60,41$ y $60,56 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹), cultivando con KNO₃ en iguales condiciones de luz, temperatura y tasa de renovación, son casi un 50% y un 21,23% menores a las obtenidas en el presente experimento con esa fuente de nitrato. Esta diferencia se debe a que la concentración de nitrógeno fue la mitad, 4 mM, y los cultivos pudieran estar en el límite entre la limitación y la saturación.

No se observan diferencias significativas entre las densidades de equilibrio alcanzadas cultivando *T. lutea* con nitrato de sodio o nitrato de calcio (en torno a $107 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹, $p > 0,05$). Esto contrasta con el resultado obtenido en el experimento anterior, donde el abono que contenía nitrato de calcio producía un 30,79% más de crecimiento que el abono que contenía nitrato de sodio. Sin embargo, como se demostró en ese experimento, la diferencia no se cubría suplementando con hierro y otros oligoelementos. Además, no se encontraron diferencias en densidad de equilibrio cuando se cultivó con nitrato de sodio comercial o de grado analítico. Por lo tanto, el mejor crecimiento observado en el experimento de los abonos debe estar asociado específicamente al nitrato de calcio comercial utilizado.

Al igual que se observó en la densidad en estacionario, la densidad alcanzada por el control (Algal con NaNO₃) en estado de equilibrio es $103,58 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ (Fig. 1.2.7), superior a todas las obtenidas en los experimentos anteriores, que de forma consistente se encuentran alrededor de $85 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹. Esto puede deberse a que en el presente experimento el pH pudiera estar mejor controlado.

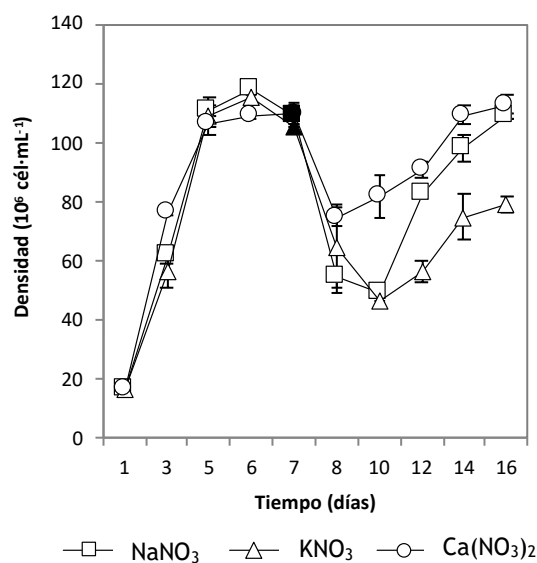


Fig. 1.2.6 Evolución de la densidad de *T. lutea* con medio Algal conteniendo distintas fuentes de nitrato a una concentración de 8 átomos-mg de nitrógeno por litro. El marcador negro indica el inicio del cultivo semicontinuo (TR diaria del 30%, n=3).

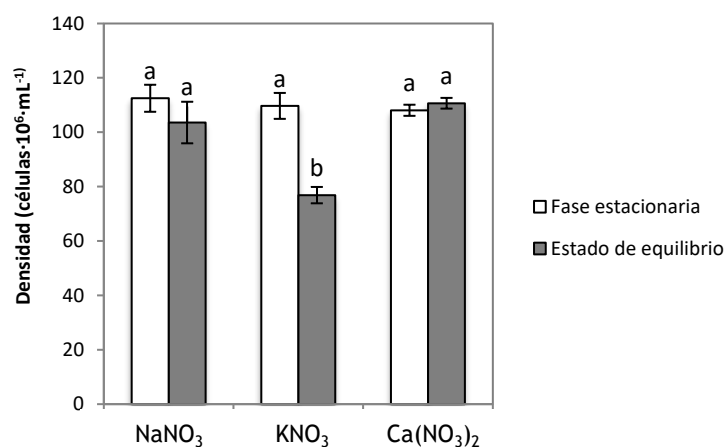


Fig. 1.2.7 Densidad en fase estacionaria y en estado de equilibrio de *T. lutea* cultivada con diferentes fuentes de nitrato (TR diaria del 30%, n=3). Diferentes letras en cada fase del cultivo indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

No hay diferencias entre el peso seco de los cultivos con nitrato de calcio y nitrato de sodio, ligeramente superiores a 2,5 g·L⁻¹, siendo ambos superiores al obtenido con nitrato de potasio Fig. 1.2.8). Por ello, el peso celular aumenta con el descenso de la densidad de equilibrio.

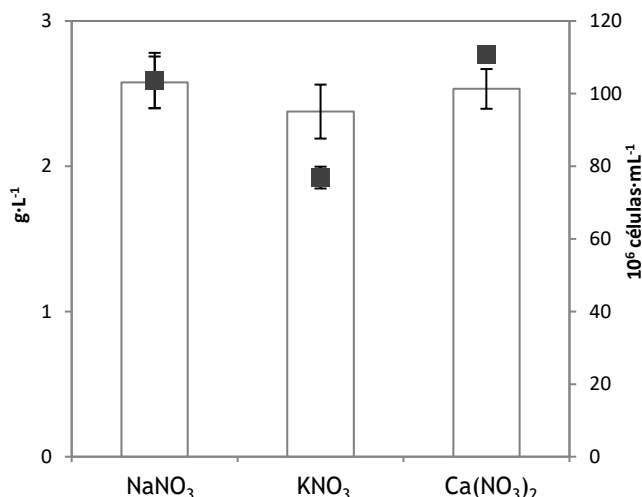


Fig. 1.2.8 Densidad (■) y peso seco (barras) en el estado de equilibrio de cultivos semicontinuos de *T. lutea* cultivada en medio Algal con distintas fuentes de nitrato (TR 30%, n=3).

El peso celular disminuye proporcionalmente con el incremento de la densidad de equilibrio ($r^2=0,995$), de 30,08 pg·célula⁻¹ en los cultivos con nitrato potásico a 23,66 y 22,60 pg·célula⁻¹ en los cultivos con nitrato de sodio y calcio, respectivamente. Por lo tanto, la productividad en peso es la misma para los tres tratamientos, en torno a 0,75 g·L⁻¹·día⁻¹, que es la más alta obtenida en los experimentos en laboratorio (Fig. 1.2.8).

En cuanto a la composición bioquímica, el incremento en peso celular en el cultivo con menor densidad celular (KNO₃) se ve justificado por el incremento en las fracciones de proteína y otros elementos, que incluyen los glúcidos, sin variación en el contenido de lípidos (Fig. 1.2.9). Esto se debe al incremento de la luz efectiva por célula en aquellos cultivos con menor densidad de equilibrio y permite una mayor incorporación de carbono y nitrógeno, reflejado en el ratio C:N, el cual no presenta diferencias significativas entre los distintos grupos, situándose en torno a 7. (Fig. 1.2.9). Este valor es inferior a(2006)nido por Ferreira (2006) que obtuvo un valor cercano a 10 para una tasa de renovación del 30% y en torno a 8 para tasas superiores, y está cerca del valor de Redfield de 6,6, al que se aproximan los cultivos sin limitación de nutrientes (Goldman *et al.*, 1989).

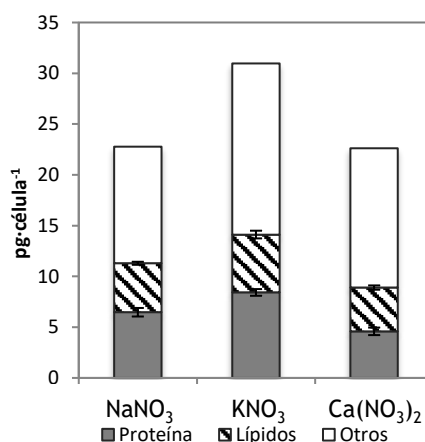


Fig. 1.2.9 Composición bioquímica en el estado de equilibrio de cultivos semicontinuos de *T. lutea* cultivada en medio Algal con distintas fuentes de nitrato (TR 30%, n=3).

Tabla 1.2.3 Composición de *T. lutea* cultivada con diferentes medios de cultivo (TR30%, n=3). Los valores en la misma fila con diferente letra presentan diferencias significativas ($p<0,05$)

		Control		Algal+OHM		Algal+OHM+B		Algal+SoID		Algal+SoID s/vit						
Fase estacionaria																
	10 ⁶ células·mL ⁻¹	98	±	1,53	97,02	±	1,05	95,2	±	6,6	86,63	±	10,2	94,15	±	3,75
Dens. equilibrio																
	10 ⁶ células·mL ⁻¹	89,32 ^a	±	0,37	82,38 ^{a,b}	±	1,57	80,71 ^{b,c}	±	1,65	87,20 ^{a,c}	±	0,13	76,06 ^b	±	3,40
Peso celular																
	pg·célula ⁻¹	18,34 ^a	±	0,93	20,05 ^a	±	0,93	19,48 ^a	±	0,37	20,94 ^a	±	1,78	20,32 ^a	±	0,76
Productividad																
	10 ⁹ células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	26,80	±	0,11	24,71	±	0,47	24,21	±	0,49	26,16	±	0,044	22,82	±	1,02
	mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹	491,34	±	25,05	495,53	±	22,99	471,65	±	8,99	547,77	±	46,51	463,75	±	17,35

Tabla 1.2.4 Crecimiento y productividad de *T. lutea* cultivada con diferentes fertilizantes agrícolas (TR30%, n=3). Los valores en la misma fila con diferente letra presentan diferencias significativas ($p<0,05$)

	Algal	Ca	Na	Ca/Na	Ca/Na sin vit	Ca/Na +oligos	Ca/Na+Fe	Na analítico
Fase estacionaria								
10^6 células·mL ⁻¹	85,92 ^a ± 4,3	84,5 ^a ± 0,66	61,83 ^c ± 0,76	77,6 ^b ± 0,85	29,7 ^e ± 0,85	88,1 ^a ± 1,71	87,53 ^a ± 1,56	49,13 ^d ± 3,19
Dens. equilibrio								
10^6 células·mL ⁻¹	77,28 ^a ± 1,54	69,63 ^{a,b} ± 0,88	53,24 ^c ± 2,54	60,16 ^{b,c,d} ± 0,4	3,27 ^e ± 0,43	55,99 ^{c,d} ± 7,20	60,41 ^{b,c,d} ± 1,58	49,53 ^c ± 1,19
Productividad								
10^9 células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	23,18 ± 0,46	20,89 ± 0,27	15,97 ± 0,76	18,05 ± 1,20	0,98 ± 0,13	16,80 ± 2,16	18,12 ± 0,47	14,86 ± 0,36

Tabla 1.2.5 Composición de *T. lutea* cultivada en medio de cultivo Algal con diferentes fuentes de nitrato (n=3)

	NaNO ₃	KNO ₃	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O
Densidad máxima			
10 ⁶ células·mL ⁻¹	112,5 ± 4,97	109,69 ± 4,77	108,02 ± 2,05
Densidad de equilibrio			
10 ⁶ células·mL ⁻¹	103,58 ± 7,64	76,88 ± 3,01	110,67 ± 1,97
Peso celular			
pg·célula ⁻¹	23,66 ± 1,70	30,08 ± 1,73	22,60 ± 1,58
Productividad			
10 ⁹ células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	31,07 ± 2,29	23,06 ± 0,90	33,20 ± 0,59
mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹	773 ± 55,74	712,86 ± 41,06	760 ± 53,18
Proteína			
pg·célula ⁻¹	6,47 ± 0,42	8,42 ± 0,33	4,59 ± 0,37
Lípidos			
pg·célula ⁻¹	4,82 ± 0,15	5,70 ± 0,38	4,31 ± 0,21
Glúcidos+otros			
pg·célula ⁻¹	11,49 ± 1,04	16,84 ± 2,00	13,70 ± 1,24
% Proteína	27,40 ± 1,27	28,09 ± 2,63	20,32 ± 1,07
% Lípidos	20,43 ± 1,16	18,90 ± 0,29	19,13 ± 1,40
% Glúcidos	52,19 ± 2,31	52,98 ± 2,43	60,54 ± 1,28
Q_c			
pg·célula ⁻¹	8,91 ± 0,74	9,09 ± 0,54	9,09 ± 0,60
Q_N			
pg·célula ⁻¹	1,07 ± 0,10	1,14 ± 0,04	1,05 ± 0,01
C:N	7,16 ± 0,29	6,98 ± 0,54	7,02 ± 0,55





1.3 Requerimientos de vitaminas de *T. lutea* en cultivo semicontinuo

INTRODUCCIÓN

Las microalgas del género *Isochrysis* y la recién reclasificada *T. lutea* se cultivan con éxito en medios convencionales como Algal, Walne o f/2, entre otros muchos (Herrero *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 2000), en cuyas formulaciones se incluyen las vitaminas tiamina (B₁), biotina (B₇ o H) y cobalamina (B₁₂) de forma rutinaria, además de un nutrido número de oligoelementos, para poder abarcar un amplio rango de especies cultivables, sin atender particularmente a los requerimientos de una única especie.

De hecho, para *I. galbana* Parke está demostrada la auxotrofia para las vitaminas B₁ y B₁₂ en cultivo axénico en *batch* y también que la biotina no entra dentro de los requerimientos (Provasoli & Carlucci, 1974). Sin embargo, las necesidades de cada vitamina pueden variar incluso entre especies del mismo género y también dependiendo de las condiciones de cultivo y la presencia de bacterias en el medio y, a pesar de que *T. lutea* es una microalga cultivada de forma rutinaria en laboratorios y criaderos de acuicultura, no se conocen sus requerimientos de vitaminas. Asumiendo que esta variedad tenga las mismas necesidades que *I. galbana* u otras primnesiofíceas, tampoco se conoce la demanda real en cultivos monoalgales continuos o semicontinuos.

Asimismo, se ha observado en otras microalgas que la microbiota bacteriana acompañante puede sintetizar y excretar vitamina B₁₂, que sería aprovechada por las microalgas, reduciendo los requerimientos para esta vitamina en cultivos no axénicos (Croft *et al.*, 2005). Sin embargo, este fenómeno no se ha observado para la tiamina (Croft *et al.*, 2006) pudiendo ser dependiente de la composición específica de la microbiota bacteriana.

En *T. lutea*, además, se han observado en nuestro laboratorio problemas de colapso repentino sin que se pudieran asociar a cambios en las condiciones de cultivo, como pH, temperatura o luz (Otero, A. Comunicación personal), por lo que se especula con la posibilidad de que las necesidades de algún nutriente del medio fueran superiores en este tipo de cultivos ultradensos y, por tanto, sería interesante evaluar si una concentración mayor de vitaminas permite un mayor crecimiento y estabilidad. Es de reseñar que el incremento del pH por encima de 8 produce la destrucción parcial de la tiamina (Kenneth Gold *et al.*, 1966) por lo que un aumento temporal del pH debido a una elevada actividad fotosintética podría ser el responsable de un posterior colapso por no haber suficiente tiamina.

Por otro lado, no existen referencias de variaciones en la composición bioquímica de las microalgas en función de la composición cualitativa o cuantitativa de vitaminas en el medio de cultivo.

Por tanto, es interesante comprobar los requerimientos de vitaminas para *T. lutea*, en cultivo no axénico y semicontinuo, lo que puede permitir reducir sensiblemente los costes del medio de cultivo y optimizar la productividad, sobre todo para sistemas de gran capacidad, determinando el efecto que pudiera tener sobre la composición bioquímica de la biomasa producida.

OBJETIVO

Optimizar el medio de cultivo Algal para *T. lutea*, determinando los requerimientos de vitaminas de esta especie.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La microalga marina *T. lutea* se cultivó en unidades de cultivo tubulares de 80 mL a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ sometidos a un régimen de luz:oscuridad 12h:12h, siendo la irradiancia $165 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se burbujeó aire en los cultivos de forma continua, enriqueciendo con CO_2 en pulsos de 10'' cada 10' durante el período de luz para mantener el pH entre 7,6 y 7,8.

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $10,2 \pm 0,31 \cdot 10^6$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 30% del volumen. Una vez alcanzado el *steady state* se recogieron muestras de biomasa para determinación de peso seco y se centrifugaron y congelaron a -20°C alícuotas de la biomasa para su posterior análisis bioquímico.

Se utilizó como base la formulación inorgánica del medio Algal (Fábregas *et al.*, 1984) 4 mM de NaNO_3 , descrita en *Material y Métodos*, incrementando proporcionalmente el resto de los nutrientes y modificando el contenido de vitaminas (Tabla 1.3.1). Como control se utilizó el medio Algal completo. Las vitaminas para todos los medios de cultivo se disolvieron en agua destilada, se filtraron con un filtro estéril de $0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de retención de partículas y se añadieron a los medios de cultivo autoclavados y fríos.

Tabla 1.3.1 Contenido en vitaminas ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) de los medios de cultivo utilizados

Medio de Cultivo	Tiamina (B_1)	Biotina (B_7)	Cobalamina (B_{12})
Control	70	20	12
X2	140	40	24
B_1	70	-	-
B_7	-	20	-
B_{12}	-	-	12
$\text{B}_1 + \text{B}_7$	70	20	-
$\text{B}_1 + \text{B}_{12}$	70	-	12
$\text{B}_7 + \text{B}_{12}$	-	20	12

Teniendo en cuenta que los medios sin B_1 no alcanzaron el estado de equilibrio, los resultados de los análisis de peso seco y bioquímicos se muestran sólo para los grupos que incluían B_1 en el medio de cultivo y que permitieron el crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo *batch*

En el sistema de cultivo *batch* (Fig. 1.3.1) se observa que los medios de cultivo que contienen B₁ (Control, X2, B1, B1+B7, B1+B12) permiten alcanzar las mayores densidades en fase estacionaria, en torno a $70 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, independientemente de la adición al medio de cultivo de las vitaminas B₇ y B₁₂, no habiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos tratamientos. Estas densidades son ligeramente superiores a los $60,41 \pm 8,6$ células·mL⁻¹ alcanzadas por Ferreira (2006) en condiciones similares de luz, concentración de nutrientes y tasa de renovación, probablemente debido a que en el presente trabajo se parte de una densidad de inóculo mayor ($10,2 \pm 0,31 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $7,2 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹). También son netamente superiores a los $11,26 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ alcanzadas por otros autores (Renaud *et al.*, 1991) probablemente debido a que la luz recibida por célula en este sistema de cultivo ($100 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) para una botella de 4 L es menor y la disponibilidad de nitrógeno (0,88 mM, medio f/2).

Duplicar la cantidad de vitaminas (medio X2) no mejora los resultados de densidad celular de la fase estacionaria frente al control durante el cultivo *batch*, así como eliminar las vitaminas B₇ y B₁₂ no afecta negativamente.

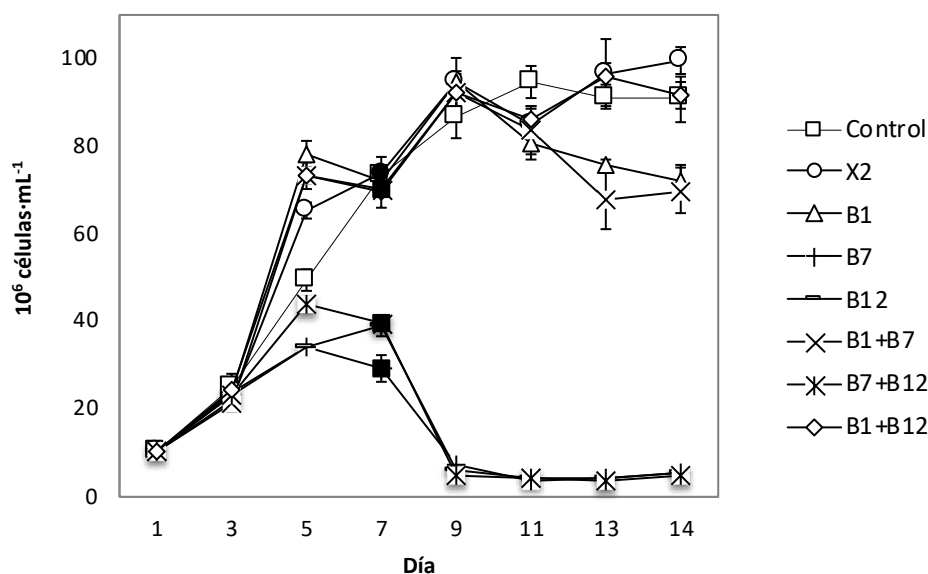


Figura 1.3.1 Evolución de la densidad de *T. lutea* en medios con distinta formulación de vitaminas. El marcador negro indica el inicio del cultivo semicontinuo con TR diaria del 30% (n=3). Control: Algal 4 mM

Sin embargo, en los medios de cultivo sin B₁ (B₇, B₁₂ y B₇+B₁₂) las densidades máximas alcanzadas no superan los $39 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, (Fig. 1.3.1) confirmando la auxotrofia de esta cepa para B₁, que no puede ser compensada con la producción por la población bacteriana acompañante. Probablemente el leve crecimiento que presenta *T. lutea* en estos medios sin B₁ añadida se sostiene en el residuo que pudiera quedar tras el inóculo, en la producción bacteriana de la vitamina o en la vitamina liberada con la muerte celular de

una pequeña parte de la población, ya que *T. lutea* puede acumular B₁ cuando se cultiva en un medio que la contenga en su formulación (Brown *et al.*, 1999).

De hecho, una vez iniciado el régimen semicontinuo, la densidad de equilibrio de estos cultivos sin B₁ (tiamina) se reduce a valores inferiores a $4,5 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ (Fig. 1.3.2) produciéndose prácticamente el lavado del cultivo, indicando que el crecimiento no es posible en ausencia de B₁ al igual que le ocurre a *I. galbana* (Provasoli & Carlucci, 1974) y a otras Prymnesiophyceae. Esta dependencia de B₁ en la formulación del medio de cultivo sólo está presente en un 22% de las especies estudiadas por Provasoli & Carlucci (1974). No se conoce ninguna microalga que no sea capaz de sintetizar la vitamina funcional a partir de los dos componentes que la forman, pirimidina y tiazol, y generalmente sólo presentan auxotrofía para uno de los dos, aunque todas pueden incorporar la vitamina ya ensamblada. En el caso de otras Prymnesiophyceae como *Monochrysis* (Pavlova) *lutheri*, *Prymnesium parvum* o *Hymenomonas elongata*, el requerimiento para la síntesis de tiamina es de pirimidina, siendo capaces de sintetizar el tiazol y ensamblar ambas subunidades para formar la vitamina funcional (Droop, 1962).

Como se mencionó anteriormente, el incremento del pH por encima de 8 produce la destrucción parcial de la tiamina (Kenneth Gold *et al.*, 1966) por lo que un aumento temporal del pH debido a una elevada actividad fotosintética podría ser el responsable de un posterior colapso por no haber suficiente tiamina.

Además, se debe tener en cuenta que en condiciones de estrés, provocado por otros factores como temperaturas cercanas al máximo, podría incrementarse el requerimiento de vitaminas. Por ejemplo, en *Chlorella* sp. que no requiere vitaminas, en temperaturas cercanas a su máximo se produce auxotrofía para algunas vitaminas (Otero, A. Comunicación personal).

La biotina (B₇) parece no ser necesaria para el cultivo de *T. lutea*, bien porque sea capaz de sintetizarla o porque sus enzimas sean independientes de biotina, ya que se observa que no hay diferencias en la densidad entre los cultivos con medio completo y en los que sólo se añade tiamina y B₁₂, tanto en *batch* como en semicontinuo. Este resultado incluye a la variedad *T. lutea* a la lista de Croft *et al.* (2006) de especies que no requieren biotina, en la que revisa los requerimientos de muchas Prymnesiophyceae, incluida *Isochrysis galbana*, concluyendo que no es necesaria. Sánchez *et al.* (2000) (2000) compararon el crecimiento de *I. galbana* en varios medios de cultivo, incluidos el Algal y el f/2, que contienen biotina, y el S-88, que carece de biotina, determinando que *I. galbana* alcanza tasas de crecimiento similares en el medio sin biotina y en el f/2, lo que sostiene la afirmación de que esta especie no requiere biotina para su crecimiento. De hecho, sólo un 5% de las especies de microalgas estudiadas requieren biotina para su crecimiento, aunque la mayoría de las especies tienen enzimas dependientes de biotina, con lo que se deduce que las microalgas tienen la habilidad de sintetizarla *de novo* (Croft *et al.*, 2006).

En el caso de la vitamina B₁₂ (cobalamina), *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri* en cultivos axénicos presentan un crecimiento dependiente de su concentración en el medio (Swift & Taylor, 1974). En el presente trabajo no se observa la necesidad de adicionar B₁₂ en el cultivo *batch*, ya que las densidades de *T. lutea* en los medios Control, X2, B₁, B₁+B₇ y B₁+B₁₂ (en torno a $70 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) no presentan diferencias significativas. Esto no necesariamente contradice los resultados de Swift & Taylor (1974), ya que los cultivos en el presente experimento no son axénicos, por lo que la carga bacteriana

podiera aportar la dosis de B₁₂ necesaria para cubrir los requerimientos. De hecho, Croft *et al* (2005) determinaron que la bacteria *Halomonas* co-cultivada con la microalga *Porphyridium*, auxótrofa para B₁₂, produce y excreta vitamina B₁₂ que puede ser aprovechada por la microalga. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Haines & Guillard (1974) en diatomeas, demostrando que las microalgas pueden incorporar la vitamina B₁₂ producida por las bacterias del medio.

Sin embargo, el hecho de que en las condiciones ensayadas no se observe requerimiento de las vitaminas B₇ y B₁₂ no implica que, bajo condiciones de estrés, no pueda aparecer-

Cultivo semicontinuo

En el *steady state*, mientras que la adición de vitamina B₇ no tiene ningún efecto sobre el crecimiento, los medios que solo llevan B₁ tienen densidades de equilibrio un 31% menores que los que además adicionan B₁₂ en el medio de cultivo (aprox. $75 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $92 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, Fig. 1.3.2). Este descenso en la densidad celular de equilibrio en aquellas que crecen en un medio sin cobalamina, y que no se aprecia en el cultivo *batch*, puede deberse a que la renovación diaria reduce el número de bacterias (Otero, 1994) que pudieran aportar esta vitamina, siendo necesaria su adición exógena para obtener la máxima densidad microalgal, porque la cantidad aportada por la microbiota acompañante no es suficiente, convirtiéndose así la B₁₂ en el nutriente limitante en estos cultivos.

La cuantificación de NaNO₃ disponible en los cultivos una vez alcanzado el *steady state* reveló que no se consumió todo el nitrógeno disponible, lo que sugiere que, en los cultivos Control, X2 y B₁+B₁₂, la limitación del crecimiento fue por otro nutriente diferente al nitrógeno. Como el grupo control y el grupo X2, que lleva el doble de cantidad de todas las vitaminas, alcanzan la misma densidad de equilibrio, la limitación del crecimiento tampoco se puede achacar a las vitaminas, con lo que se podría pensar en que estos cultivos están limitados por luz u otro elemento distinto al NaNO₃. Los cultivos B₁ y B₁+B₇ están claramente limitados por B₁₂.

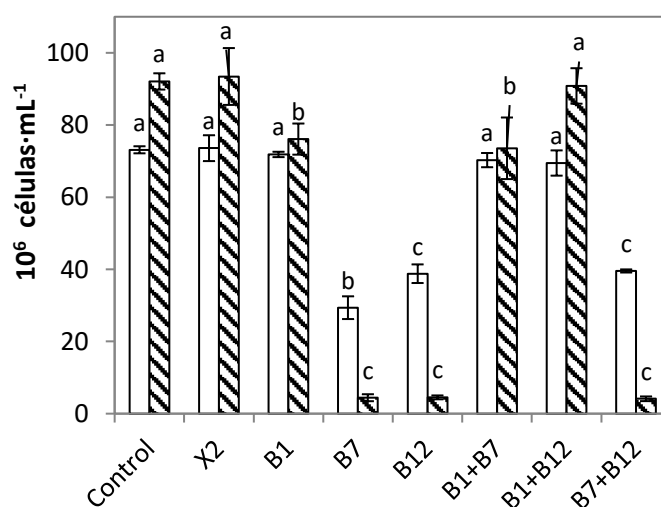


Figura 1.3.2 Densidad celular alcanzada en fase estacionaria (barras blancas) y en estado de equilibrio (barras rayadas) por *T. lutea* con 4 mM de N (n=3). Letras diferentes en los superíndices de cada fase del cultivo indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Al contrario de lo que acontece típicamente en los cultivos semicontinuos, la densidad de equilibrio de *T. lutea* se sitúa por encima de la densidad en estacionaria (Fig. 1.3.2, Tabla 1.3.2), en los medios que incorporan las dos vitaminas necesarias para el crecimiento. Esto puede deberse al acúmulo de alguna sustancia autoinhibidora del crecimiento, que se retiraría al iniciar la renovación o la adición con la renovación de algún nutriente limitante. Ferreira (2006) también observa en sus cultivos de *T. lutea*, en condiciones de cultivo casi idénticas, este fenómeno, que también se ha referenciado para otras especies de microalgas: Richmond (2003), define para *Nannochloropsis* sp. el umbral de densidad, que sería difícil sobrepasar debido a metabolitos excretados con capacidad autoinhibitoria. Para *Isochrysis galbana* se ha determinado que las células excretan un metabolito que inhibe el crecimiento, con efecto dosis-dependiente, que ha sido identificado como ácido 1-[hidroxil-dietilmalonato] isopropil dodecenoico ($C_{22}H_{38}O_7$) (Sun *et al.*, 2008). Este metabolito tiene efecto tanto autoinhibitorio como inhibidor del crecimiento de otras especies de microalgas. En cultivos continuos y semicontinuos esta inhibición se ve limitada (Richmond, 2003), atribuyéndolo a la eliminación de parte del metabolito con la renovación del cultivo, pero también es razonable pensar que los cultivos continuos y semicontinuos mantienen las poblaciones microalgales en fase logarítmica, sin metabolismo secundario, que será el que genera esta sustancia inhibitoria.

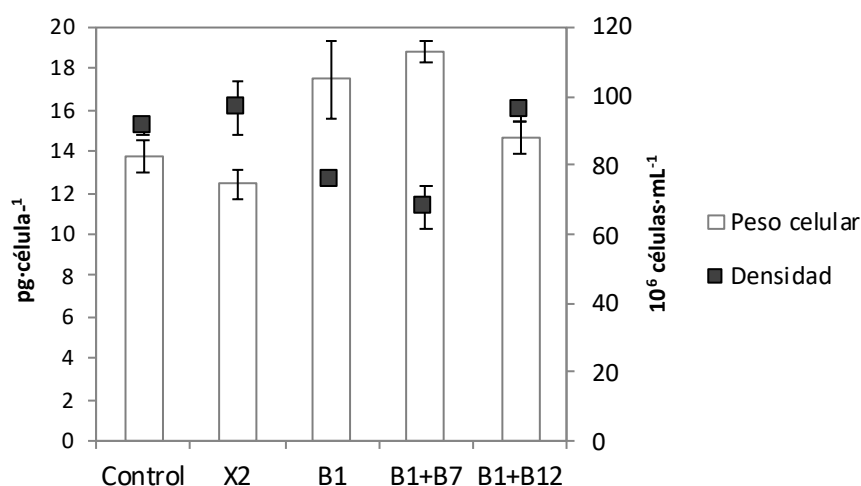


Figura 1.3.3 Peso y densidad celulares en equilibrio de *T. lutea* cultivada con medios con diferente formulación de vitaminas (TR 30%, n=3).

Las diferencias observadas en la densidad de equilibrio están inversamente correlacionadas con las diferencias en el peso celular ($r^2=0,91$, Fig. 1.3.3, Tabla 1.3.2). Aquellos cultivos que alcanzan una densidad de equilibrio mayor (Control, X2 y B1+B12) presentan los pesos celulares más bajos, cercanos a 14 pg·célula⁻¹. Por el contrario, aquellas limitadas por B₁₂, que alcanzan una densidad de equilibrio menor, tienen a su disposición una mayor cantidad de nutrientes y luz por célula, lo que les permiten incrementar su peso en torno a 18 pg·célula⁻¹. El peso seco de *T. lutea* puede variar mucho según las condiciones de cultivo. Seixas *et al.* (2008) cultivando *T. lutea* en semicontinuo en sistemas de 1 L con una luz similar, determinó que el peso celular de *T. lutea* alcanzó los $30 \pm 2,8$ pg·célula⁻¹, más del doble del peso alcanzado por el Control en el presente experimento. Esto se debe a que la menor disponibilidad de luz por célula en el sistema de 1 L conlleva una densidad de equilibrio muy inferior ($20,8 \pm 2,3 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) con

un incremento en la disponibilidad de nutrientes (4 mM), que permiten el incremento del tamaño. Para condiciones de cultivo casi idénticas al control del presente experimento (Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*, 2008), que permitieron una densidad de estabilización menor ($60 \cdot 10^6$ frente a $92 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ en el presente experimento), el peso seco obtenido fue similar, de $14,49 \pm 0,86$ pg·célula⁻¹. Esto conduce a productividades volumétricas superiores en el presente experimento tanto en células·L⁻¹·día⁻¹ ($18,17 \cdot 10^9$ frente a $27,5 \cdot 10^9$) como en peso (263 mg·L⁻¹·día⁻¹ frente a valores en torno a 360 y 420 mg·L⁻¹·día⁻¹).

Las productividades volumétricas en peso obtenidas con los medios de cultivo que llevan las vitaminas necesarias (Tabla 1.3.2), son similares a las obtenidas en medios sin B₁₂ (397,43 y 382,5 mg·L⁻¹·día⁻¹). Esto es debido a que el incremento de peso por célula que experimentaron las microalgas cultivadas con medio B₁ y B₁+B₇ compensa la menor densidad de equilibrio. Por lo tanto, aunque la productividad en número de células·L⁻¹·día⁻¹ es menor en estas condiciones (Tabla 1.3.2), el aporte de B₁₂ no mejora la productividad en peso. En cualquier caso, las productividades obtenidas con este sistema de cultivo son mejores que descritas en sistemas al aire libre, con luz natural. En un reactor al aire libre operado como turbidostato consiguieron mantener la producción de *T. lutea* durante 30 días con una productividad de 250 mg·L⁻¹·día⁻¹ (Boussiba *et al.*, 1988), inferior a la obtenida en el presente experimento (entre 420 y 360 mg·L⁻¹·día⁻¹) debido a que la tasa de renovación es casi la mitad a la aplicada en el presente trabajo (15,60% frente al 30%).

Composición bioquímica

En cuanto a la composición bioquímica, existen ligeras variaciones en los distintos medios de cultivo, motivadas fundamentalmente por las diferentes densidades de estabilización, que modifican la luz disponible por célula.

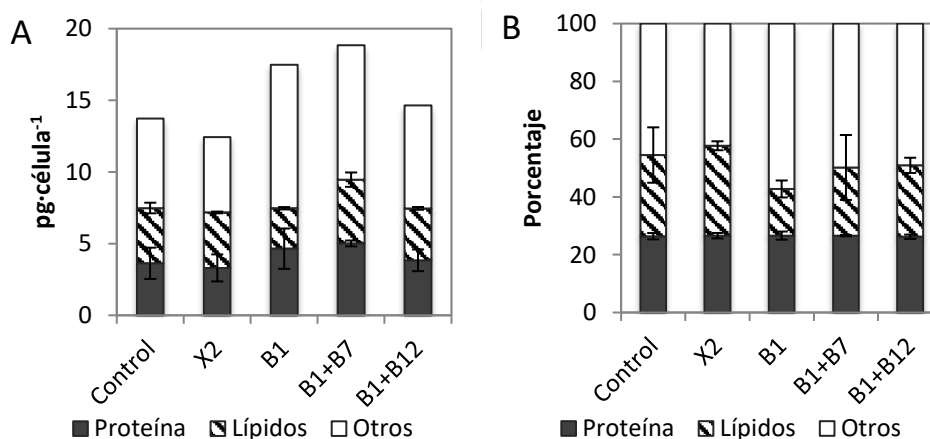


Figura 1.3.4 Contenido por célula (A) y porcentaje relativo al peso seco (B) de proteína, lípidos y otras fracciones de *T. lutea* cultivada con medios con diferente formulación de vitaminas (TR 30%, n=3).

El hecho de que el nitrógeno no es limitante se observa, además, en la relación C:N, que se mantiene constante en torno a 8 en todas las condiciones (Tabla 1.3.3), lo que implica que se incorporaron carbono y nitrógeno (en forma de CO₂ y NaNO₃) proporcionalmente

en todas las condiciones, a pesar de que la densidad de equilibrio es inferior en los cultivos sin B₁₂. De hecho, estas células presentan un peso celular mayor motivado por un incremento proporcional en las fracciones de proteína y otros (Fig. 1.3.4A) debido a una mayor disponibilidad de luz y nutrientes por célula. Esta mayor disponibilidad de luz se observa, además, en los lípidos por célula, contando con una mayor cantidad (entre 3,62 y 4,45 pg·célula⁻¹) en aquellas condiciones que recibían menor cantidad de luz por célula, por presentar una mayor densidad, frente a valores en torno a 3 pg·célula⁻¹ en los cultivos con menor densidad de estabilización. Este incremento está motivado por los lípidos polares asociados a los tilacoides y también se ve reflejado en el porcentaje de lípidos.

No obstante, cuando se observa el porcentaje de proteína relativo en el peso seco (Fig. 1.3.4B), éste no varía entre las células de las diferentes condiciones ya que la incorporación de nitrógeno y carbono es proporcional en todos los medios y, mientras que el nitrógeno se dirige mayoritariamente a la producción de proteínas, el carbono puede encontrarse en lípidos o carbohidratos dependiendo de otros parámetros del cultivo, como es la luz en este caso.

El contenido del presente capítulo, incluidas las figuras 1.1.2, 1.1.4, 1.1.9, 1.2.1, 1.2.4, 1.2.7 y 1.3.2, y las tablas 1.1.1, 1.2.1, 1.2.2, y 1.3.1, se ha reproducido parcialmente en el artículo "Impact of culture media and temperature on productivity and fatty acid profile of semicontinuous cultures of *Tisochrysis lutea*" enviado a la revista *Algal Research*, pendiente de publicación. Autores: A. Cortina-Burgueño^a, G. Acién^b, A. González^c, M. Ferreira^d y A. Otero^a.

^a Instituto de Acuicultura y Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología. Edificio CIBUS, Campus Vida. Universidade de Santiago de Compostela. 15782. Santiago de Compostela. Spain.

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería, Almería, Spain.

^c Estación Experimental Las Palmerillas, Fundación Cajamar, Almería, Spain.

^d ANFACO-CECOPECA, Departamento de Acuicultura, Ctra. Colegio Universitario, 16, 36310 Vigo, Spain.

Tabla 1.3.2 Crecimiento, peso celular y productividad de *T. lutea* cultivada en *batch* y semicontinuo (TR 30%) con medios de cultivo a los que se les ha modificado la composición de vitaminas. La composición de los medios se muestra en la Tabla 1.3.1. Los datos representan la media \pm std, $n=3$. Los valores en la misma fila con diferente letra presentan diferencias significativas ($p<0,05$). Los datos de peso seco están disponibles para las condiciones que permitieron el crecimiento celular.

	Control	X2	B ₁	B ₇	B ₁₂	B ₁ +B ₇	B ₁ +B ₁₂	B ₇ +B ₁₂
Fase estacionaria								
10 ⁶ células·mL ⁻¹	73,13 \pm 0,98	73,58 \pm 3,58	71,84 \pm 0,74	29,37 \pm 3,15	38,79 \pm 2,58	70,27 \pm 1,97	69,46 \pm 3,5	39,55 \pm 0,43
	a	a	a	b	c	a	a	c
Dens. equilibrio								
10 ⁶ células·mL ⁻¹	92,07 \pm 2,25	93,44 \pm 7,87	76,09 \pm 4,31	4,42 \pm 0,96	4,51 \pm 0,54	73,54 \pm 8,54	90,82 \pm 4,92	4,12 \pm 0,65
	a	a	b	c	c	b	a	c
Peso celular								
pg·célula ⁻¹	13,74 \pm 0,78	12,44 \pm 0,73	17,47 \pm 1,86	-	-	18,85 \pm 0,52	14,65 \pm 0,74	-
	a	a	b	-	-	b	a	-
Productividad								
10 ⁹ células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	27,62 \pm 0,68	28,03 \pm 2,36	22,83 \pm 1,29	1,33 \pm 0,29	1,35 \pm 0,16	22,06 \pm 2,56	27,25 \pm 1,48	1,24 \pm 0,19
mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹	375 \pm 21,21	360 \pm 21,21	397,43 \pm 42,31	-	-	382,5 \pm 10,61	420 \pm 21,21	-

Tabla 1.3.3 Composición bioquímica de *T. lutea* cultivada en semicontinuo (TR 30%) con medios de cultivo al que se le ha modificado la composición de vitaminas. La composición de los medios se muestra en la Tabla 1.3.1. Los datos representan la media \pm std, n=3. Los valores en la misma fila con diferente letra presentan diferencias significativas ($p<0,05$). Los datos están disponibles para las condiciones que permitieron el crecimiento celular

Especies para las colonias que permanecen en crecimiento celular										
	Control		X2		B ₁		B ₁ +B ₇		B ₁ +B ₁₂	
Proteína										
pg·célula ⁻¹	3,63 ^a	± 0,15	3,31 ^a	± 0,12	4,65 ^b	± 0,25	5,02 ^b	± 0,04	3,84 ^a	± 0,11
Lípidos										
pg·célula ⁻¹	3,86 ^a	± 0,37	3,87 ^a	± 0,06	2,82 ^b	± 0,08	4,45 ^b	± 0,50	3,62 ^a	± 0,10
Otros										
pg·célula ⁻¹	6,25	± 1,81	5,26	± 1,77	10,00	± 2,05	9,39	± 1,20	7,19	± 2,00
% Proteína	26,41 ^a	± 1,09	26,59 ^a	± 0,94	26,62 ^a	± 1,41	26,60 ^a	± 0,20	26,22 ^a	± 0,76
% Lípidos	28,10 ^a	± 2,69	31,08 ^a	± 0,46	16,14 ^b	± 0,47	21,71 ^c	± 3,77	24,73 ^c	± 0,70
% Glúcidos	45,50	± 2,53	42,29	± 4,96	57,24	± 1,85	49,79	± 3,66	49,07	± 4,61
Q _c										
pg·célula ⁻¹	5,37 ^a	± 0,81	5,34 ^a	± 0,26	7,69 ^b	± 1,47	7,87 ^b	± 0,93	6,95 ^c	± 1,31
Q _N										
pg·célula ⁻¹	0,63 ^a	± 0,03	0,62 ^a	± 0,09	0,80 ^b	± 0,04	0,86 ^b	± 0,01	0,61	± 0,02
C:N	8,02 ^a	± 0,36	7,93 ^a	± 0,90	8,20 ^a	± 0,18	8,29 ^a	± 0,12	8,11 ^a	± 0,09





Capítulo 2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE BIOMASA Y PRODUCTOS DERIVADOS DE *T. lutea*

2.1 Cultivo industrial de *T. lutea* e *I. galbana*

INTRODUCCIÓN

T. lutea e *I. galbana* se han cultivado tradicionalmente utilizando luz natural, tanto en sistemas de cultivo poco controlados (*raceways*, bolsas de plástico u *open ponds*) como en fotobioreactores altamente controlados (reactores planos, reactores tubulares, columnas de burbujeo). Sin embargo, es muy difícil comparar las productividades de los distintos sistemas debido a encontrarse en ubicaciones diferentes, con iluminación y temperatura distintas, parámetros que más influyen la productividad de las microalgas.

En la Estación Experimental Las Palmerillas, situada en El Ejido (Almería) se presentan unas condiciones privilegiadas para el estudio de la producción industrial de microalgas, ya que disponen de los sistemas de cultivo más utilizados, tanto en criaderos de acuicultura como en instalaciones de producción, así como de luz y temperatura favorables para la obtención de altas productividades (De Andrade *et al.*, 2016; Fernández-Sevilla *et al.*, 2010; Ippoliti *et al.*, 2016; Mendoza *et al.*, 2013).

Como se vio en el Capítulo 1, *T. lutea* e *I. galbana* tienen rangos de crecimiento solapantes, con temperaturas óptimas diferentes. *I. galbana* presentó mayor crecimiento a 15 °C con un rango de temperatura entre 15 a 27 °C mientras que *T. lutea* tuvo su óptimo a 27°C, aunque demostró buen crecimiento a 22 °C y con indicios de poder soportar temperaturas hasta 35 °C de forma puntual. Por lo tanto, ambas especies podrían cultivarse estacionalmente en exteriores donde el control de temperatura es más complicado, para evitar bajas productividades y colapsos de los cultivos, utilizando *I. galbana* en otoño/invierno y *T. lutea* en primavera/verano.

En el presente capítulo se exponen los resultados de la comparación de cultivos *batch* y semicontinuos de *T. lutea* e *I. galbana* en dos épocas del año con distinta luz disponible y temperatura en distintos sistemas de cultivo.

OBJETIVO

Determinar la productividad de cultivos semicontinuos de *T. lutea* e *I. galbana* en columnas de burbujeo en dos épocas del año con horas de luz y temperaturas sensiblemente diferentes (meses de julio y noviembre).

Determinar la productividad de *T. lutea* en distintos sistemas de cultivo (columna de burbujeo, bolsa cilíndrica, bolsa plana y fotobiorreactor tubular horizontal en dos épocas del año).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los inóculos de *I. galbana* CCMP 1323 e *T. lutea* (T-ISO) CCMP 1324 se cultivaron en botellones de 5 L en medio de cultivo Algal con una concentración de nitrógeno 4 mM sometidos a un régimen de luz:oscuridad 12h:12h, siendo la intensidad luminosa $200 \pm 2,15 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se burbujeó aire en los cultivos de forma continua, enriqueciendo con CO_2 en pulsos de 10'' cada 10' durante el período de luz para mantener el pH entre 7,6 y 7,8.

A escala industrial, ambas especies se cultivaron en agua de riego ultrafiltrada y ozonizada a la que se añadieron $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl, fertilizante basado en NaNO_3 y K_2HPO_4 y oligoelementos, hasta una concentración de nitrógeno de 12 mM, y las vitaminas tiamina y B_{12} en una concentración de 140 y $12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tratamiento 3, Tabla 1.2.2).

Comparación de cultivos de *T. lutea* e *I. galbana* en columnas de burbujeo

Se emplearon 20 L de cada especie para inocular dos columnas de burbujeo de 25 cm de diámetro y 100 L de volumen, con control de temperatura por intercambiador de calor y control de pH con sonda conectada a electroválvula.

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $7,86 \pm 1,32 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 30% del volumen. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se recogieron muestras de biomasa para determinación de peso seco y se centrifugaron y congelaron a -20°C alícuotas de los cultivos para su posterior análisis bioquímico.

Comparación de cultivos de *T. lutea* en distintos sistemas de cultivo

Los sistemas de cultivo evaluados fueron una columna de 100 L y 25 cm de diámetro (Sánchez Mirón *et al.*, 2002), un sistema de panel consistente en una bolsa de polietileno de 200 L y 5 cm de paso de luz (Sierra *et al.*, 2008), un fotobiorreactor tubular horizontal airlift de 4.000 L y 10 cm de paso de luz (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010) y el sistema tradicional de cultivo en bolsa de polietileno de 400 L y 60 cm de diámetro (Beiras *et al.*, 1993), son un diseño propio del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería. Estos se situaron en un invernadero en la EE Las Palmerillas, con aireación, control de temperatura a 27°C y pH 7,8 por enriquecimiento del aire con CO_2 .

El cultivo en fase logarítmica de una columna de burbujeo de 100 L se utilizó para inocular la bolsa plana de, dos bolsas cilíndricas, una columna de burbujeo y un reactor tubular horizontal, con control de temperatura mediante intercambiadores de calor y, salvo en el caso de una de las bolsas cilíndricas, control de pH con sonda conectada a electroválvula que permitió la adición de CO_2 a demanda. La densidad inicial de los sistemas estuvo en torno a $10 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 30% del volumen. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se recogieron muestras de biomasa para determinación de peso seco y se centrifugaron y congelaron a -20°C alícuotas de los cultivos para su posterior análisis bioquímico.

La luz disponible y la temperatura media en los períodos en los que se realizan los experimentos están descritos en la Tabla 2.1.1.

Tabla 2.1.1 Datos de radiación solar en la estación meteorológica de Almería (36.836; -2.402) del 15 de junio al 30 de julio de 2011 y del 1 al 30 de noviembre de 2011, según la Agencia Andaluza de la Energía y de temperaturas media, máxima y mínima según termómetro del invernadero.

	Verano 2011	Otoño 2011
Duración del día (horas)	14	10
Altitud máxima solar (grados)	75	36
Energía recibida (Kwh·m⁻²)	7,7	2,8
Temperatura media (°C)	29,28	20,2
Temperatura máxima (°C)	42,56	24,15
Temperatura mínima (°C)	19,01	17,04



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo *batch* de *T. lutea* e *I. galbana* en columnas de burbujeo de 100 L en julio y noviembre

Como se esperaba, el cultivo de *T. lutea* alcanza más el doble de densidad en fase estacionaria en julio que en noviembre ($44,5 \pm 0,7 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $22,63 \pm 1,4 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, Fig. 2.1.1A). En noviembre, además la tasa de crecimiento es menor, requiriéndose 5 días más para alcanzar la fase estacionaria. La menor densidad alcanzada en noviembre se debió a la menor duración de los días (10 h frente a 14 h en julio) y una mayor inclinación del sol (36 ° frente a 75 °) que propició que la radiación incidente total fuera un 63,64% menor (de 7,7 Kwh·m⁻² en julio a 2,8 7 Kwh·m⁻² en noviembre). De la misma manera probablemente influyó la temperatura media dentro del cultivo que en julio estuvo en torno a 27 °C, óptimo para esta especie, mientras que en noviembre fue de 20 °C.

En julio, el análisis de la concentración de nutrientes en el medio en los últimos días de cultivo reveló que aún quedaba nitrato disponible, 2,13 y 3,26 mM para *T. lutea* e *I. galbana* respectivamente, sugiriendo que el factor limitante para ambos cultivos fue la luz.

En el caso de *I. galbana* la densidad en fase estacionaria fue también sensiblemente menor en noviembre ($19,95 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $29,65 \pm 1,31 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, Fig. 2.1.1B) a pesar de que la temperatura media dentro del cultivo fue más cercana al óptimo en noviembre (20°C) que en julio (27 °C). En noviembre la tasa de crecimiento fue baja debido a una menor radiación.

La temperatura ambiental dentro del invernadero alcanzó 42,56 °C en las horas centrales del día durante el mes de julio por lo que el sistema de intercambio de calor, utilizado para controlar la temperatura, fue imprescindible para el éxito de los cultivos, pero insuficiente para cultivar *I. galbana* en su temperatura óptima. Esto se debió a que la velocidad máxima de paso de agua fría por el intercambiador está limitada y no permitió bajar la temperatura por debajo de 27 °C en julio. Esto justifica las diferencias en densidad entre *T. lutea* e *I. galbana*, como se observaba en el Capítulo 1.1 para cultivos de laboratorio. En noviembre, siendo la temperatura interna media 20 °C, más cercana al óptimo de *I. galbana* y aún en el rango favorable de *T. lutea*, no hay diferencias entre las densidades máximas de ambas especies.

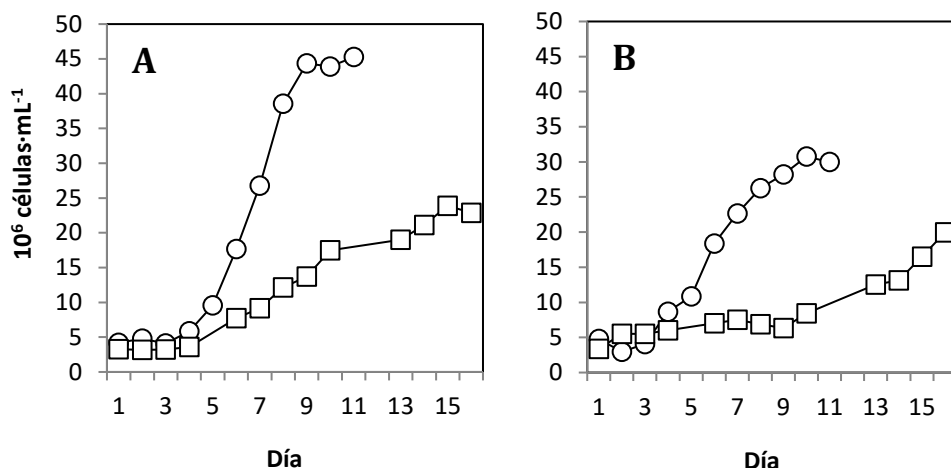


Fig. 2.1.1 Evolución de la densidad de *T. lutea* (A) e *I. galbana* (B) en cultivo *batch* durante los meses julio (○) y noviembre (□)

Cultivo semicontinuo de *T. lutea* e *I. galbana* en columnas de burbujeo de 100 L en julio y noviembre

En julio se realizó además cultivo semicontinuo de ambas especies con una tasa de renovación diaria del 30% en columna de burbujeo (Fig. 2.1.2). La densidad de equilibrio también fue superior en *T. lutea* ($26,41 \pm 0,90 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a $14,76 \pm 0,37 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *I. galbana*) con la temperatura como factor determinante de la diferencia entre ambas especies, como se observó en el cultivo *batch*. Cabe destacar que la columna de *I. galbana* en el día 20 de cultivo sufrió un problema en el intercambiador de calor y como consecuencia el cultivo alcanzó los 36°C . Esta temperatura es letal para *I. galbana*, como se demuestra en el Capítulo 1.1, por lo que el cultivo entró en declive y se colapsó en los 5 días siguientes. Sin embargo, hasta ese momento, se consigue un cultivo estable de *I. galbana* también en verano, aunque menos productivo y más sensible que el de *T. lutea*.

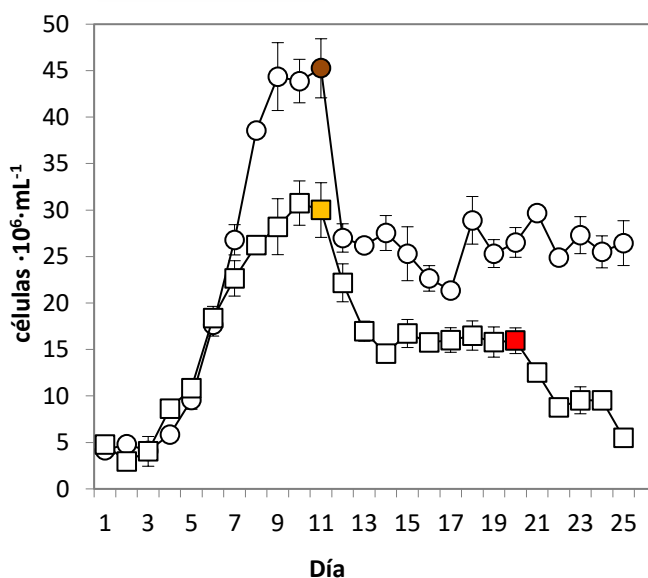


Fig. 2.1.2 Evolución de la densidad de *T. lutea* (○) e *I. galbana* (□) en cultivo *batch* y semicontinuo (TR 30%) durante el mes de julio en la E.E. Las Palmerillas (Almería). El marcador rojo indica un problema en el control de temperatura de *I. galbana*.

Esto pone de manifiesto la necesidad de elegir adecuadamente las especies a cultivar dependiendo de los parámetros de cultivo que se puedan controlar, con el fin de obtener una productividad máxima sin riesgo de colapsos.

En este experimento, el peso celular de *T. lutea* es inferior al de *I. galbana* ($29,03 \pm 0,28$ pg·cél.⁻¹ frente a $38,29 \pm 3,13$ pg·cél.⁻¹ respectivamente). Sin embargo, esta diferencia en peso celular no compensa para *I. galbana* la menor densidad de equilibrio, por lo que la productividad de ésta es inferior a la de *T. lutea* ($0,18$ g·L⁻¹·día⁻¹ frente a $0,22$ g·L⁻¹·día⁻¹, Fig. 2.1.3), patrón ya observado en el Capítulo 1 a escala de laboratorio, aunque las productividades en laboratorio fueron superiores ($0,3$ g·L⁻¹·día⁻¹ frente a $0,6$ g·L⁻¹·día⁻¹ para *I. galbana* y *T. lutea* respectivamente). Esta productividad es muy inferior a la obtenida por Qiang & Richmond (1994) de $1,6$ g·L⁻¹·día⁻¹ en columna de burbujeo debido a que el paso de luz es diez veces mayor en el presente experimento, reduciendo la luz disponible por célula y limitando la productividad. Disminuir el paso de luz podría incrementar la densidad, como observaron Molina-Grima *et al.*, (1994) en fotobiorreactor tubular, con $0,32$ g·L⁻¹·día⁻¹ para la cepa ALII de *I. galbana*, o Liu *et al.*, (2013) para *T. lutea* en panel o columna de 3 cm de diámetro ($0,72$ y $0,41$ g·L⁻¹·día⁻¹ respectivamente).

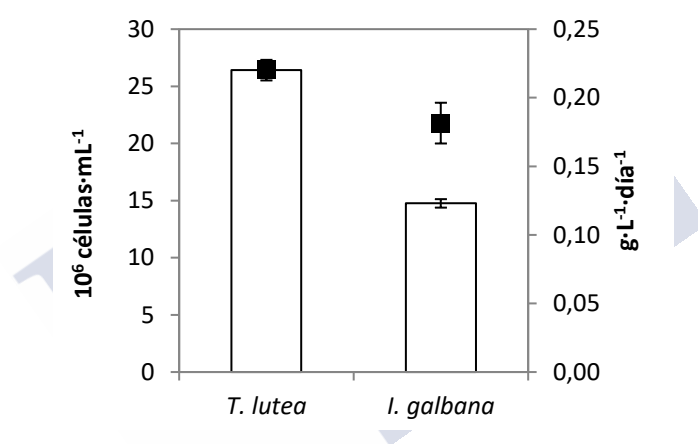


Fig. 2.1.3 Comparación de la densidad en estado de equilibrio (□) y productividad de biomasa (■) de *T. lutea* e *I. galbana* en cultivo semicontinuo con un 30% de TR durante el mes de julio en la E. E. Las Palmerillas (Almería).

El contenido en nitrógeno de ambas especies es similar, en torno a $1,98$ pg·cél.⁻¹ (Tabla 2.1.2). Ambos cultivos estaban saturados por nitrógeno, cuyo remanente fue de $7,98$ mM para *T. lutea* y $8,23$ mM para *I. galbana*. Esto hace que el porcentaje de proteína sea mayor en la biomasa de *T. lutea* ($39,85\%$ frente a $29,81\%$) y que la relación C:N sea mayor en *I. galbana* ($6,13$ frente a $5,44$). Esto se explica por la mayor disponibilidad de luz por célula en los cultivos de *I. galbana*, causada por una menor densidad de equilibrio, que le permitió seguir sintetizando lípidos y glúcidos dando salida al poder reductor generado, al no haber limitación de carbono y estar los metabolismos de N y C desacoplados (Cheng *et al.*, 2014).

Cultivo semicontinuo de *T. lutea* en reactor tubular horizontal en julio y noviembre

El reactor tubular horizontal se inoculó con *T. lutea* procedente de dos columnas de burbujeo de 100 L con densidades iniciales de $1,64 \cdot 10^6$ y $1,1 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ en julio y noviembre respectivamente. Se cultivó en *batch* hasta que alcanzó la fase estacionaria temprana, momento en el cual se inició un régimen de renovaciones de 30% del volumen

de lunes a viernes en las primeras horas de luz, cuando el personal de la planta estaba disponible. La ausencia de renovación se indica en la gráfica mediante una línea discontinua.

El reactor horizontal alcanzó una densidad máxima en fase estacionaria de $68,14 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ en el mes de julio (Fig. 2.1.4), un 34,7% mayor que la alcanzada en la columna de burbujeo ($44,5 \pm 0,7 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) y poniendo de manifiesto que la disponibilidad de luz en el reactor tubular, con un diámetro de tubo de 9 cm, es mayor que en la columna de 25 cm de diámetro. En noviembre la densidad en fase estacionaria fue un 22,91% menor que en verano ($52,53 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) que es más del doble que la densidad alcanzada por la columna de burbujeo en la misma época del año ($22,63 \pm 1,4 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹). Teniendo en cuenta que en la columna de burbujeo la diferencia entre las densidades de equilibrio obtenidas en julio y noviembre es del 50%, parece confirmarse que en el fotobiorreactor hay al menos un factor limitando el crecimiento. Como los nutrientes no son limitantes (1,2 mM nitrato residual), seguramente la densidad en el fotobiorreactor en julio fue menor de la que cabría esperar porque se produjo fotoinhibición durante las horas centrales del día, cuando la temperatura del cultivo se encontraba en valores subóptimos (en torno a 35 °C). Como se vio en el Capítulo 1, es probable que en temperaturas subóptimas los cultivos sean más sensibles a la fotoinhibición, incluso con irradiancias bajas (Cuaresma Franco *et al.*, 2012).

Cuando se comparan los resultados del cultivo semicontinuo de *T. lutea* en las dos épocas del año con una tasa de renovación del 30%, la densidad es un 22,9% mayor en el mes de julio ($39,83 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $29,05 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹, Fig. 2.1.5).

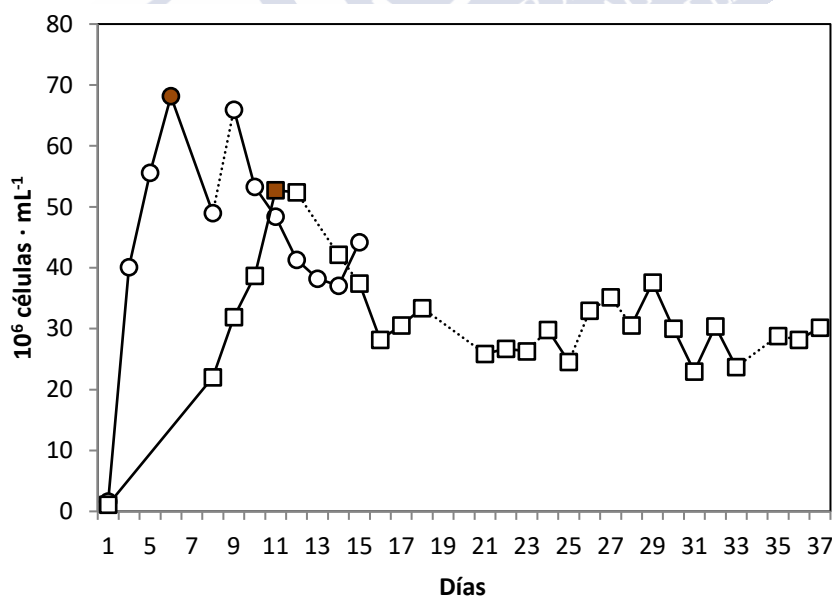


Fig. 2.1.4 Evolución de la densidad de *T. lutea* en cultivo *batch* y semicontinuo con TR del 30% durante los meses de julio (○) y noviembre (□) en reactor tubular horizontal de 4.000 L. El marcador oscuro indica el inicio del cultivo semicontinuo. Las líneas discontinuas (.....) indican días sin renovación.

La menor densidad celular se traduce en que la productividad en peso durante el mes de noviembre (Fig. 2.1.5) es un 14,6% menor (111 frente a 130 mg·L⁻¹·día⁻¹). La productividad celular es un 27% menor que en julio, cosechando $8,72 \cdot 10^9$ células·L⁻¹·día⁻¹ frente a $11,97$ células·L⁻¹·día⁻¹.

No hay diferencias significativas (Test Tukey, $p < 0,05$) entre el peso celular de *T. lutea* en julio y noviembre a pesar de la diferencia en las densidades de equilibrio (en torno a $12 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$, Tabla 2.1.1). En este caso, como la diferencia en densidades está directamente relacionada con la disponibilidad de luz (y no la limitación por nitrógeno), la fotoinhibición a la que se vio sometido el cultivo en julio produjo una densidad celular menor a la que cabría esperar y se pudo producir un ligero exceso de poder reductor que se desvió al metabolismo de carbono. Así, el contenido de proteína es menor en julio (4,69 frente a $5,94 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1}$) y la relación C:N es ligeramente mayor en julio (5,4 frente a 4,98).

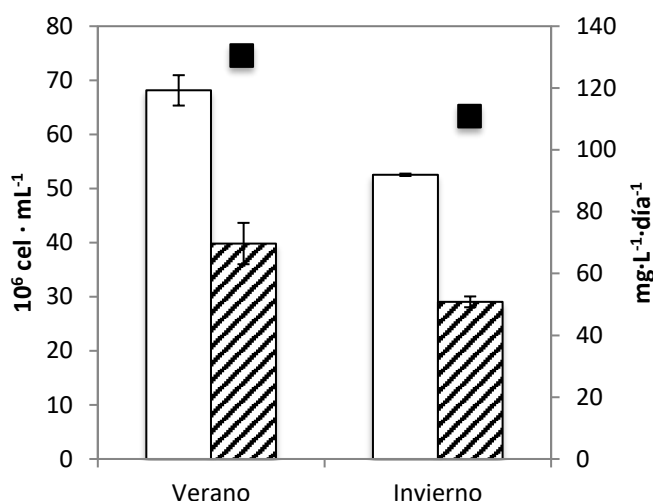


Fig. 2.1.5 Comparación de la densidad en fase estacionaria (barra blanca), estado de equilibrio (barra rayada) y productividad en peso (■) de *T. lutea* cultivada en un fotobiorreactor tubular horizontal en batch con una tasa de renovación del 30%.

Como ambos cultivos están saturados de nitrógeno, el porcentaje de proteína es ligeramente superior en noviembre (42,09 frente a 40,02%, Tabla 2.1.3). Igualmente, Sukenik y Wahnnon (1991) demostraron que no hay diferencias en el contenido de proteína de cultivos de *T. lutea* operados en turbidostato con diferentes intensidades luminosas a temperatura constante de 25°C . Sin embargo, si se considera la Q_N la diferencia es mayor, con $0,79 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ en las células cultivadas en julio frente $1,2 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ en noviembre (Fig. 2.1.6.). En el Capítulo 1.1 para *T. lutea*, donde los cultivos a 22 y 27°C tenían densidades de equilibrio y pesos celulares similares, las células cultivadas a 22°C presentan un contenido de en nitrógeno superior y una relación C:N inferior que las cultivadas a 27°C . Por lo tanto, no se puede descartar que, además de la luz disponible por célula, la temperatura afecta a la acumulación de nitrógeno. Ferreira (2006) observó que en cultivos semicontinuos de *T. lutea* con una TR 30% y diferentes intensidades luminosas, los cultivos con intensidad luminosa menor presentaban mayor contenido en nitrógeno y una relación C:N menor. Estos datos sugieren que la luz y la temperatura interaccionan e influyen en el metabolismo de nitrógeno para compensar el efecto de temperaturas subóptimas.

Como ambos cultivos están saturados de nitrógeno, el porcentaje de proteína es ligeramente superior en noviembre (42,09 frente a 40,02%, Tabla 2.1.3). Igualmente, Sukenik y Wahnnon (1991) demostraron que no hay diferencias en el contenido de proteína de cultivos de *T. lutea* operados en turbidostato con diferentes intensidades luminosas a temperatura constante de 25°C . Sin embargo, si se considera la Q_N la diferencia es mayor,

con $0,79 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ en las células cultivadas en julio frente $1,2 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ en noviembre (Fig. 2.1.6.). En el Capítulo 1.1 para *T. lutea*, donde los cultivos a 22 y 27°C tenían densidades de equilibrio y pesos celulares similares, las células cultivadas a 22°C presentan un contenido de en nitrógeno superior y una relación C:N inferior que las cultivadas a 27°C . Por lo tanto, no se puede descartar que, además de la luz disponible por célula, la temperatura afecta a la acumulación de nitrógeno. Ferreira (2006) observó que en cultivos semicontinuos de *T. lutea* con una TR 30% y diferentes intensidades luminosas, los cultivos con intensidad luminosa menor presentaban mayor contenido en nitrógeno y una relación C:N menor. Estos datos sugieren que la luz y la temperatura interaccionan e influyen en el metabolismo de nitrógeno para compensar el efecto de temperaturas subóptimas.

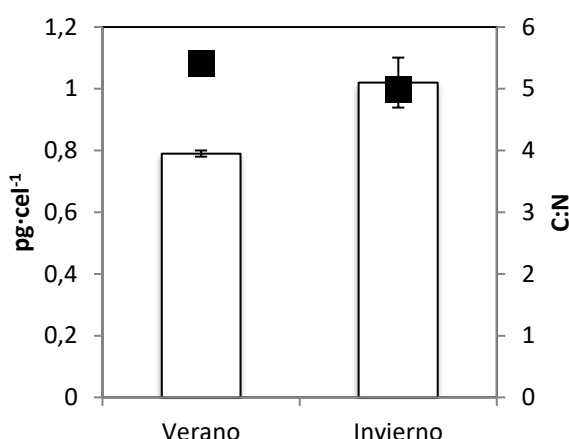


Fig. 2.1.6 Cuota celular de nitrógeno Q_N (barras) y relación C:N (■) de cultivos semicontinuos de *T. lutea* en fotobiorreactor tubular horizontal con una tasa de renovación diaria del 30% en dos épocas del año

Cultivo semicontinuo de *T. lutea* en distintos sistemas de cultivo en julio y noviembre

Se cultivó *T. lutea* simultáneamente en distintos sistemas de cultivo que incluyen una columna de burbujeo de 100 L con pH y temperatura controlados y 25 cm de diámetro, una bolsa con forma de panel y 5 cm de paso de luz y dos bolsas cilíndricas típicas de criadero de acuicultura de 400 L y 60 cm de diámetro con y sin control de pH. Una vez alcanzada la fase estacionaria, se inició el cultivo semicontinuo con una tasa de renovación diaria del 30% del volumen.

En julio, todos los sistemas, salvo la bolsa sin control de pH en la que no se observó crecimiento, alcanzaron la fase estacionaria tras 7 días de cultivo, sin apreciarse una *lag* en el inicio del crecimiento. En noviembre los sistemas presentan menor tasa de crecimiento y un retardo en el inicio del crecimiento de 4 días antes de empezar a dividirse exponencialmente. Ningún sistema estaba limitado por nutrientes o CO_2 , salvo la bolsa cilíndrica sin control de pH, por lo que probablemente, el factor limitante del crecimiento fue la luz actuando conjuntamente con la temperatura, que afecta a la tasa de crecimiento.

Como se observa en la figura 3.1.7, el sistema que permiten que se alcance la mayor densidad es la bolsa plana tanto en julio como en noviembre ($42,66$ y $41 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente) e igualmente alcanza la mayor densidad en estado de equilibrio para las dos épocas del año (Tabla 3.1.4). Todos los sistemas son el doble de productivos en julio comparados con noviembre, lo que concuerda con la mayor disponibilidad de luz debido a la época del año, salvo la bolsa cilíndrica sin adición de CO_2 .

De esta manera existe una elevada correlación entre las menores densidades alcanzadas y el incremento del paso de luz del sistema de cultivo ($r^2 > 0,83$), tanto para la fase estacionaria como el estado de equilibrio en ambas épocas del año (Tabla 2.1.4) que se justifica por el incremento de la densidad celular con el incremento de la irradiancia incidente por célula y la temperatura.

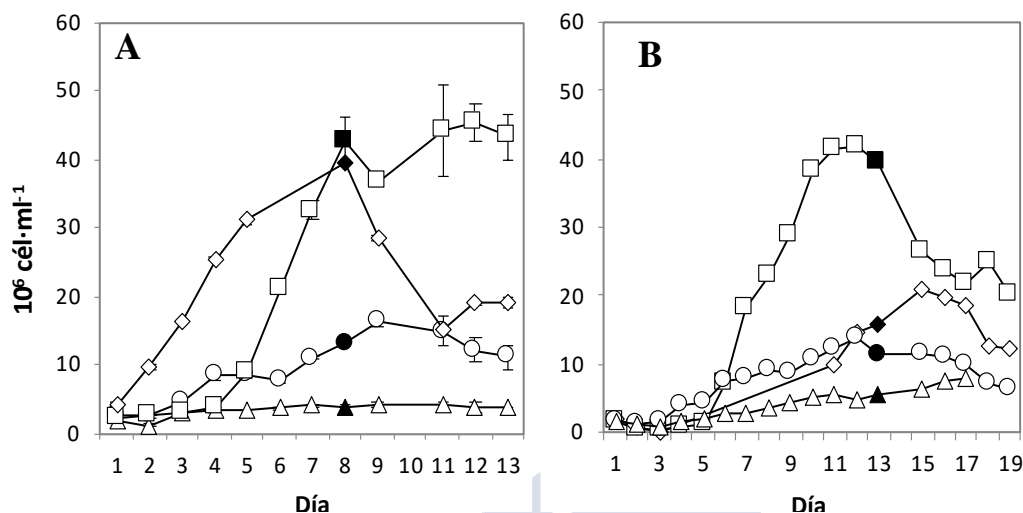


Fig. 2.1.7 Evolución de la densidad de *T. lutea* en cultivo *batch* y semicontinuo durante los meses julio (A) y noviembre (B) en distintos sistemas de cultivo: Bolsa plana 200L (cuadrado), Columna de burbujeo 100 L (rombo), Bolsa cilíndrica con CO₂ 350 L (círculo) y Bolsa cilíndrica sin CO₂ 350 L (triángulo). El marcador negro indica el inicio de la renovación.

El retraso inicial de 4 días en el crecimiento en noviembre ya se observó para esta especie en cultivos con luz natural (Molina Grima *et al.*, 1994; Van Bergeijk *et al.*, 2010) y generalmente se atribuye a la fotoinhibición debida al incremento de la luz en el cultivo a causa de la dilución del inóculo. Igualmente podría deberse al estado del inóculo que, junto con la concentración inicial, es un parámetro fundamental del escalado que generalmente no se tiene en cuenta. Tras este período de *lag*, *T. lutea* creció con normalidad en todos los sistemas. Las columnas de burbujeo normalmente se utilizan en interior, con luz artificial (Chini-Zittelli *et al.*, 2003; Oncel & Sukan, 2008; Ranjbar *et al.*, 2008) pero, en el presente trabajo, el cultivo con luz natural para *T. lutea* se muestra posible en este sistema y permite obtener cultivos densos.

En julio, la densidad alcanzada en la columna de burbujeo de 100 L (con control de temperatura e inyección de CO₂ para mantener el pH en 7,8) fue de $19 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ y es similar a la obtenida en cultivos densos de menor volumen en laboratorio (Capítulo 3, (Seixas *et al.*, 2008) aunque el volumen es mucho mayor en la columna, probablemente debido a que el diámetro de los sistemas es similar, igualando la cantidad de luz recibida por célula. Varios autores también identifican la cantidad de luz recibida por célula como el parámetro responsable de una mayor productividad (Chini Zittelli *et al.*, 2000; Qiang & Richmond, 1994; Zhang & Richmond, 2003), ya sea por incremento de la iluminación incidente o por reducción del paso de luz del reactor. Cabe destacar que la densidad alcanzada en el presente experimento es menor a la obtenida en el experimento anterior en columna de burbujeo en equilibrio ($19 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a $26,41 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$). Este peor resultado pudiera estar relacionado con el incremento de la temperatura ambiental según avanzó el verano, que supuso un incremento de la temperatura media de la columna, por encima del óptimo de 27 °C.

En el caso de la bolsa plana es el sistema más productivo de todos los ensayados, tanto en julio como en noviembre, alcanzando más del doble de densidad en julio que en noviembre, con $44 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $20,35 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ respectivamente.

La bolsa cilíndrica sin adición de CO₂ presenta un crecimiento muy bajo pero alcanza el doble de densidad en noviembre que en julio ($7,73 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ frente a $3,87 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) probablemente debido a que, en condiciones de limitación de CO₂ el sistema se encuentra sin capacidad de adaptación a la elevada irradiancia durante las horas centrales del día junto con temperaturas por encima del óptimo, observándose un efecto fotoinhibidor sobre el cultivo en verano que no tiene lugar en invierno.

La baja productividad de las bolsas cilíndricas de elevado diámetro para el cultivo de microalgas ya es conocida (Müller-Feuga, 2000; Tredici, 2004) y sin embargo es un sistema frecuente de cultivo debido a su bajo coste. Esto se debe a que la mayoría de los sistemas de cultivo son caros y de complicado manejo. De hecho, la mayoría de los fotobiorreactores se fabrican con materiales de precio elevado como metacrilato (Fábregas *et al.*, 2002; Tamburic *et al.*, 2011), frágiles como el vidrio (Zhang & Richmond, 2003) o difíciles de limpiar y de deterioro rápido como el policarbonato. A pesar de esto, los reactores planos, con una elevada relación superficie/volumen son mejor opción que las bolsas tradicionales porque, además del mejor aprovechamiento de la luz, se pueden escalar sin perder productividad, alargando el sistema. Además, son los diseños que mejor gestionan la eliminación del O₂, el reparto de nutrientes y la prevención de la sedimentación (Grobbelaar, 2009; Sierra *et al.*, 2008; Zhang & Richmond, 2003). La bolsa plana de polietileno de 5 cm resultó 3,5 veces más productiva que la cilíndrica, con costes similares de producción y mantenimiento, permite mejorar la productividad *in situ* y por lo tanto reducir los costes de producción de microalga, que para un criadero pueden alcanzar el 30% de los costes totales (Coutteau & Sorgeloos, 1993).

Densidades similares a las obtenidas en la bolsa plana y la columna también se han conseguido en sistemas abiertos para *T. lutea*. En un sistema tipo *raceway*, con elevada relación superficie/volumen (Boussiba *et al.*, 1988), se consiguieron $43 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ en 12 días, con un inóculo similar. Kaplan *et al.* (1986), en miniestanques de 150 L con iluminación natural, consigue una densidad máxima de $50 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹. Sin embargo, a pesar de que en sistemas abiertos también se pueden obtener elevadas productividades, en acuicultura este tipo de producción no es viable en localizaciones con elevada evaporación o riesgo de precipitación, no asegurando, además, un cultivo fiable a largo plazo, ya que hay mayor riesgo de colapso por predación, competición con otras especies o contaminación bacteriana.

Tabla 2.1.2 Composición de *T. lutea* e *I. galbana* cultivadas en régimen semicontinuo (TR diaria 30%) en columnas de burbujeo de 100 L en verano e invierno.

	<i>T. lutea</i>	<i>I. galbana</i>
Densidad estacionaria verano		
10 ⁶ células·mL ⁻¹	44,5 ± 0,7	29,65 ± 1,31
Densidad estacionaria invierno		
10 ⁶ células·mL ⁻¹	22,63 ± 1,4	19,95 ± 2,44
Densidad equilibrio		
10 ⁶ células·mL ⁻¹	26,41 ± 0,90	14,76 ± 0,37
Peso celular		
pg·célula ⁻¹	29,03 ± 0,28	38,29 ± 3,13
Productividad		
10 ⁹ células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	7,92 ± 0,27	4,43 ± 0,11
mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹	220 ± 2,12	180 ± 14,89
Proteína		
pg·célula ⁻¹	11,57 ± 0,30	11,41 ± 0,97
% Proteína	39,85 ± 1,02	29,81 ± 2,53
Q_c		
pg·célula ⁻¹	12,66 ± 0,20	14,07 ± 1,00
Q_N		
pg·célula ⁻¹	1,99 ± 0,05	1,97 ± 0,17
C:N	5,44 ± 0,05	6,13 ± 0,09

Tabla 2.1.3 Composición de *T. lutea* cultivada en régimen semicontinuo (TR diaria 30%) en fotobiorreactor tubular horizontal de 4.000 L en verano e invierno.

	Julio	Noviembre
Densidad estacionaria		
10 ⁶ células·mL ⁻¹	68,14 ± 2,81	52,53 ± 0,22
Densidad equilibrio		
10 ⁶ células·mL ⁻¹	39,83 ± 3,82	29,05 ± 1,00
Peso celular		
pg·célula ⁻¹	11,60 ± 0,15	12,78 ± 1,51
Productividad		
10 ⁹ células·L ⁻¹ ·día ⁻¹	11,95 ± 1,15	8,72 ± 0,3
mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹	130 ± 0,17	111 ± 1,7
Proteína		
pg·célula ⁻¹	4,64 ± 0,01	5,94 ± 0,081
% Proteína	40,02	42,19
Q_c		
pg·célula ⁻¹	5,11 ± 0	5,95 ± 0,64
Q_N		
pg·célula ⁻¹	0,79 ± 0,07	1,02 ± 0,11
C:N	5,4	4,98

Tabla 2.1.4 Densidad y correlación de la densidad con el paso de luz del sistema de cultivo para *T. lutea* cultivada en distintos sistemas de cultivo en fase estacionaria (final de cultivo *batch*) y en estado de equilibrio (cultivo semicontinuo con tasa de renovación diaria del 30% del volumen) en dos épocas del año. r^2 indica la correlación entre el paso de luz y la densidad para todos los sistemas menos la bolsa sin CO₂.

	Paso de luz (cm)	Julio				Noviembre			
		densidad estacionaria (10 ⁶ cel·mL ⁻¹)	densidad equilibrio (10 ⁶ cel·mL ⁻¹)	Productividad (10 ⁹ cel·L ⁻¹ ·día ⁻¹)	Productividad (g·L ⁻¹ ·día ⁻¹)	densidad estacionaria (10 ⁶ cel·mL ⁻¹)	densidad equilibrio (10 ⁶ cel·mL ⁻¹)	Productividad (10 ⁹ cel·L ⁻¹ ·día ⁻¹)	Productividad (g·L ⁻¹ ·día ⁻¹)
Bolsa plana	5	42,66	44,25	13,28	0,285	41,9	20,35	6,11	0,129
Columna burbujeo	25	39,3	18,94	5,68	0,144	20,85	12,49	3,75	0,078
Bolsa cilíndrica c/ CO ₂	60	13,17	11,5	3,45	0,070	11,44	7,4	2,22	0,063
Bolsa cilíndrica s/ CO ₂	60	3,87	3,84	1,15	-	5,47	7,73	2,32	-
r^2		0,98	0,83			0,87	0,92		



2.2 Preparación y Preservación de Concentrados de *T. lutea* a Escala Industrial

INTRODUCCIÓN

Existen en el mercado preparados de microalgas elaborados mediante centrifugación industrial, principalmente de *Nannochloropsis gaditana*, y preservación en frío para satisfacer las necesidades de los criaderos ante la ausencia de producción *in situ*. Estos productos permiten dosificar la biomasa microalgal de acuerdo con las instrucciones del fabricante, resuspenderla en agua y suministrarla a sus cultivos, sin tener que dedicar tiempo, infraestructura y otros recursos a mantener un cultivo auxiliar de microalgas.

Sin embargo, estos productos no terminan de satisfacer a los acuicultores, que son reacios a abandonar sus cultivos de microalgas *in situ*. La insatisfacción está motivada principalmente por la baja calidad de dichos productos que, además de tener una fecha de caducidad temprana (sufren un deterioro rápido), presentan grumos, muerte celular con incremento de la concentración de bacterias y baja permanencia en la columna de agua, lo cual dificulta su ingesta y merma su valor nutritivo y calidad bacteriológica para los organismos cultivados. Además, debido a la agresividad que los procesos de concentración ejercen sobre las células, muy pocas especies son comercializables en este formato pues no se preserva su integridad cuando las paredes celulares son frágiles o no están definidas, como es el caso de *T. lutea* (Liu & Lin, 2001).

El método más habitual de concentración es la centrifugación, que a nivel industrial se realiza con centrífugas continuas que presentan un elevado consumo energético y requieren de una inversión inicial considerable. El uso de flocculantes para separar la biomasa del medio es también un método habitual pero no es adecuado para acuicultura debido a la naturaleza de los flocculantes y las propiedades del producto resultante que, aun siendo biocompatibles como el quitosano, disminuyen la digestibilidad de la biomasa microalgal. No existen estudios previos que analicen el impacto del procesamiento en centrífugas continuas sobre la durabilidad de la biomasa de *T. lutea* en condiciones controladas. Así mismo, al contrario que en la industria alimentaria, apenas hay estudios enfocados al uso de conservantes (aditivos y atmósferas protectoras) para la elaboración de preparados comerciales de calidad que puedan ser atractivos para los acuicultores.

Las centrífugas continuas más empleadas en la industria son las centrífugas de discos (Milledge & Heaven, 2013) que pueden aplicar una fuerza centrífuga de entre 4.000 y 14.000 g. Este dispositivo consiste en un recipiente poco profundo y cilíndrico que contiene una serie de láminas o discos cónicos rotatorios con muy poca separación entre ellos. La centrífuga se alimenta con el cultivo cuyas células se desea separar. El cultivo entra por el centro del grupo de discos bajo la influencia de la fuerza centrífuga, que hace viajar a las partículas más densas hacia fuera y por debajo de los discos. Idealmente, el tamaño de partícula a separar está entre 3 μm y 30 μm a una concentración entre 0,02 y 25% de sólidos, equivalente a 0,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 250 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Perry, 1973). El tamaño celular de las microalgas más utilizadas en acuicultura por lo general se sitúa en el cuartil inferior del rango recomendado, con 12 μm para *T. suecica*, 5 μm para *T. lutea* o *Chaetoceros* sp. y 2 μm para *N. gaditana*.

Aunque hay varios estudios que hacen referencia a la eficiencia de las centrífugas industriales para concentrar la biomasa microalgal, estos se centran principalmente en la eficiencia energética y la viabilidad económica (Dassey & Theegala, 2013; Gerardo *et al.*, 2015; Milledge & Heaven, 2013; Molina Grima *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2013), habiendo muy pocos precedentes que analicen el impacto del procesamiento con centrífugas sobre la durabilidad de la biomasa de microalgas en condiciones controladas (D'Souza *et al.*, 2000; Heasman *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2009) y ningún registro sobre el estudio de centrífugas continuas.

Cabe esperar que, al igual que ocurre con las centrífugas de laboratorio, la centrifugación industrial produzca deterioro celular, el cual se verá acentuado a lo largo de la etapa de refrigeración. Así mismo, es probable que, modificando los parámetros de operación de la centrífuga, como el caudal de entrada o el tiempo de residencia del cultivo dentro de la centrífuga, se pueda controlar el daño celular.

Igualmente, es anecdótico el empleo de aditivos para intentar incrementar la longevidad de los preparados. En la bibliografía se hace referencia al uso de aditivos alimentarios como crioprotectores, vitamina C y ácido cítrico, aunque sin éxito (Guevara *et al.*, 2011; Heasman *et al.*, 2000).

Hasta el momento tampoco se han publicado resultados sobre la preservación de concentrados microalgales con atmósferas modificadas. El envasado en atmósferas modificadas o protectoras es una técnica empleada para prolongar la vida media de productos frescos o mínimamente procesados, que consiste en cambiar la composición del aire que rodea al producto, disminuyendo la degradación natural de éste. En frutas y verduras es habitual utilizar CO₂ para disminuir la degradación aerobia del producto y reducir el pH. También se emplea el nitrógeno gaseoso N₂, que es un gas inerte no reactivo que no permite el crecimiento de microorganismos aerobios (aunque no previene el deterioro por anaerobios) y evita los procesos de oxidación al excluir el oxígeno. El O₂ en concentraciones superiores al nivel crítico también inhibe la proliferación bacteriana y por ello también es empleado para determinadas aplicaciones en la industria alimentaria (Sandhya, 2010).

Por todo ello, en esta sección se detallan los trabajos realizados para determinar el efecto del diseño de centrífugas industriales sobre la calidad de la biomasa, la capacidad de control de esta calidad mediante la modificación de los parámetros de operación de dichas centrífugas y la mejora de la vida media del producto mediante la preservación en atmósferas protectoras.

OBJETIVO

El objetivo general es optimizar la elaboración de concentrados de *T. lutea* con la finalidad de incrementar su durabilidad para su consumo en acuicultura mediante la optimización de los parámetros de centrifugación y envasado.

De forma particular se desea seleccionar la centrífuga más adecuada de entre aquellas disponibles, optimizar los parámetros de cosechado de biomasa de *T. lutea* y prolongar su vida útil mediante el empleo de atmósferas protectoras.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Comparación de centrífugas industriales

Las centrífugas industriales de marcas Westfalia, Alfa Laval y Flottweg, descritas en material y métodos se utilizaron para procesar la biomasa procedente del cultivo producido en el fotobiorreactor tubular horizontal durante el mes de julio de 2011 operado en semicontinuo con una tasa de renovación diaria del 30% (Sección 3.1).

La centrífuga de alimentación continua Westfalia procesa el cultivo incorporado a un tambor rotatorio (6.300 g) reteniendo las células en las paredes interiores y eliminando el líquido clarificado (medio de cultivo) mediante una bomba centrípeta. Se centrifugaron 20 L de cultivo de *T. lutea* hasta que se llenó el recipiente (y el líquido expulsado comenzaba a ser oscuro al contener células no retenidas). La pasta resultante se extrajo del tambor y se tomaron muestras para su análisis.

Las centrífugas de discos Alfa Laval (11.130 g) y Flottweg (10.000 g) procesan el cultivo bombeando al interior, a través de una tobera o inyector, donde los discos rotatorios expulsan el agua y retienen las partículas hasta que se llenan los espacios entre ellos. Durante la operación normal de la centrífuga, se alimenta con cultivo durante 20 minutos por bombeo, tras los cuales se realiza un lavado automático de los discos que expulsa las partículas retenidas. En el presente experimento se bombearon 250 L durante 20 minutos y se recogieron los lodos separados en bidones de 20 L esterilizados con ozono. Se tomaron muestras para su análisis.

Optimización de la centrífuga Alfa Laval

La centrífuga Alfa Laval se operó para introducir cultivo a caudal fijo de $600 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos tras los cuales se realizó una descarga para expulsar la biomasa acumulada en los discos. Aunque en el momento del diseño experimental se determinó que la descarga se realizaba con el propio medio de cultivo clarificado, tras un análisis de la salinidad del concentrado resultante se sospecha que se realiza con agua dulce. Se elaboraron 6 concentrados, procedentes de cada descarga de la centrífuga, que se preservaron a 4°C en envases estériles.

Se comprobó mediante observación al microscopio para todas las condiciones probadas que el agua clarificada no contenía células.

Se analizó la densidad de los concentrados, la resistencia a suspensión de las células, y el crecimiento bacteriano en TSA-1 y TCBS, en el momento de la elaboración de las pastas y tras 7 días de refrigeración a 4°C .

Envasado con atmósferas protectoras

Para evaluar el efecto de diferentes gases como sobre la preservación de los concentrados de *T. lutea*, se utilizó concentrado elaborado con la centrífuga Alfa Laval tras 20 minutos de entrada de cultivo. Se depositó la biomasa concentrada en recipientes estériles y se burbujearon diferentes gases durante un minuto con difusores cerámicos estériles, tras lo cual se procedió a la toma de muestras y al sellado de los recipientes. Estos tenían un volumen de 250 mL se llenaron con 200 mL de concentrado de *T. lutea* al 10% p/v.

Los gases burbujeados fueron CO_2 , N_2 y O_2 . Para descartar que el efecto del burbujeo produjese ningún daño, una de las muestras se preparó burbujeadó aire filtrado.

Se analizó la densidad de los concentrados, la resistencia a suspensión de las células, y el crecimiento bacteriano en de aerobios totales en TSA-1 y de *Vibrio* sp. en TCBS, en el momento de la elaboración de las pastas y tras 7 días de refrigeración a 4°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación de centrífugas industriales

La densidad del cultivo de *T. lutea* empleado para la prueba era de $26,29 \cdot 10^6$ cél·mL⁻¹ con un peso celular de 11,6 pg·cél⁻¹, procedente de la renovación del 30% del volumen del fotobiorreactor tubular (Capítulo 2.1) y almacenado en un tanque opaco sin control de temperatura hasta el momento del procesado. La temperatura del cultivo en el momento de la centrifugación era de 35°C.

La centrífuga Westfalia produjo una pasta concentrada (W) con un 85% de sólidos. Esta pasta, con una consistencia similar a la arcilla, no se pudo reconstituir ni utilizando un vórtex por lo que se descartó para su uso. La consistencia compacta de esta pasta limita su aplicabilidad para ser utilizada en el cultivo de organismos filtradores en acuicultura, donde es necesario que la biomasa reconstituída no tenga grumos ni agregados de partículas que dificultarían la filtración de las especies cultivadas en los criaderos (rotíferos, larvas de moluscos y crustáceos...).

La consistencia arcillosa y compacta con un 85% de sólidos reduciría también el interés en utilizarlo para la congelación a -20°C y posterior liofilización como se verá en la sección 3.2, donde los productos elaborados con parámetros similares produjeron peores resultados de resistencia celular tras la reconstitución.

Los concentrados elaborados con las centrífugas industriales Alfa Laval y Flottweg operadas con los protocolos habituales (alimentación durante 20 minutos hasta descarga con un caudal de entrada de 800 L·h⁻¹ en el caso de la Alfa Laval, y 5 minutos con un caudal de 3 m³·h⁻¹ en el caso de la Flottweg) produjeron un concentrado con un 10% de sólidos. Tras centrifugar 250 L aproximadamente se recuperaron 0,75 kg de biomasa húmeda de cada centrífuga.

Ambas centrífugas produjeron un concentrado con una densidad en torno a $2 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹. Este valor es 4 veces inferior al esperado para un concentrado al 10% p/v elaborado a partir de células que pesan 11,6 pg. Tras repetir el experimento y comprobar que los datos son correctos, es probable que el error estuviera en el método de determinación de contenido de sólidos (gravimetría tras secado) que no se hubieran eliminado del todo los residuos de sal o que en el cultivo se pudieran encontrar otras partículas (no celulares) que no se contabilizan en el recuento, pero aportan peso.

Tras reconstituir el concentrado a la densidad original del cultivo, las células centrifugadas con la máquina Alfa Laval (AL) no se degradaron mientras que la integridad celular del concentrado elaborado con la Flottweg (F) disminuyó un 90% (Figura 2.2.1A).

Estas diferencias en la resistencia inicial a la reconstitución no pueden explicarse por diferencias en la fuerza centrífuga ya que ambas centrífugas ejercen fuerzas similares (11.000 y 10.000 g). Varios autores han identificado que las bombas centrífugas utilizadas en fotobiorreactores producen un efecto cizalla que daña las células de determinadas

especies como *T. lutea* y algunas diatomeas, impidiendo su crecimiento, siendo este daño proporcional al caudal de la bomba (Carvalho *et al.*, 2006; Michels *et al.*, 2016). Teniendo esto en cuenta, la diferencia entre el daño producido por las centrífugas podría residir en el caudal de alimentación ($0,8$ frente a $3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), que está definido por el tamaño de la bomba que introduce el cultivo. La fricción alcanzada en la bomba más potente de la centrífuga Flottweg puede ser, por lo tanto, la responsable de dicha degradación celular.

Sin embargo, tras siete días preservado 4°C , la densidad del concentrado AL se redujo drásticamente ($-64,42\%$), no ocurriendo así en el concentrado F, que mantuvo la densidad inicial (Figura 2.2.1B). Como se menciona en el diseño experimental, tras indagar se concluyó que, para realizar la descarga de la biomasa, la centrífuga Alfa Laval utilizaba una toma de agua dulce en lugar de medio cultivo clarificado. Probablemente el choque osmótico causó la degradación celular de estas células tras 7 días en un medio hipotónico debido a la carencia de pared celular. Sería necesario repetir este experimento para confirmar que no hay degradación debida a los movimientos de cizalla dentro de la centrífuga utilizando agua salada al 3% .

Ambas centrífugas ejercen un impacto sobre la resistencia celular superior al que se produce en centrífugas discontinuas a 9.000 g (-24% tras 7 días en concentrados elaborados con cultivos de TR30%, sección 3.1). Aunque en el caso del concentrado F se confirma que hay otros parámetros que contribuyen a la degradación, además de la fuerza centrífuga, como el caudal de la bomba, en el caso del concentrado AL no se puede aseverar si el efecto es derivado de la salinidad del agua empleada para la descarga.

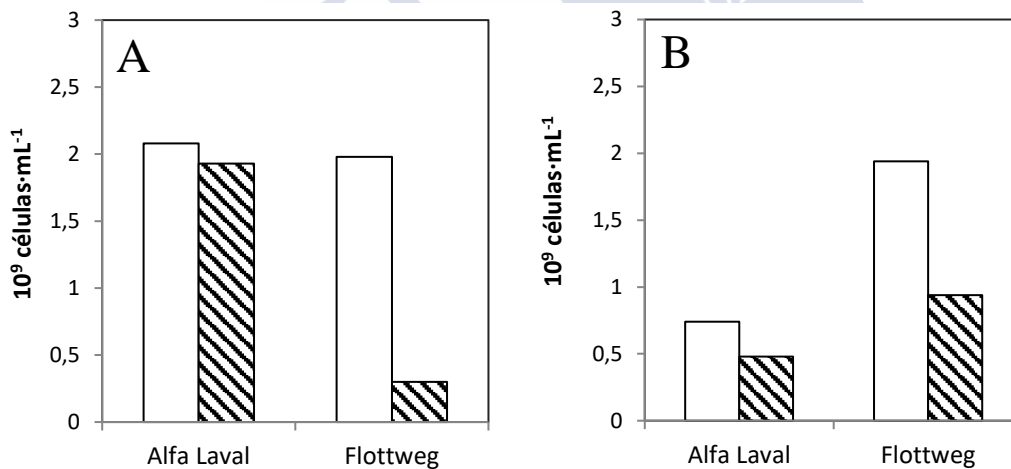


Fig. 2.2.1 Densidad de concentrados elaborados con las centrífugas Alfa Laval y Flottweg en el momento de la elaboración (barra blanca) y tras reconstituir a la densidad de cultivo (barra rayada) el día de la centrifugación (A) y tras siete días refrigerado a 4°C (B).

Para realizar una medida directa del daño celular que se produce durante el proceso de cosechado, se determinó el carbono orgánico total (TOC) en el agua de los concentrados en el momento de la elaboración de los concentrados (T_0). El TOC es un indicador de la calidad de la biomasa ya que valores altos de materia orgánica en el medio del concentrado indican la destrucción de las células tras el proceso de centrifugación y la materia orgánica liberada al medio podría incrementar la proliferación bacteriana en cultivos destinados a la acuicultura.

La carga orgánica en el medio del concentrado F en T_0 es similar a la obtenida en ambos concentrados elaborados en el laboratorio, en torno a $11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig 3.2.2, sección 3.1) y es ligeramente inferior al concentrado AL, con $12,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, sugiriendo que este carbono orgánico no procede de la rotura celular debida al procesamiento con las centrífugas, sino a la materia extracelular que ya se encuentra en los cultivos, probablemente exopolisacáridos (Ferreira, 2006) y al daño que se haga evidente tras la resuspensión por adición de agua para normalizar el concentrado a 10% p/v. También indica que las células se degradan durante el almacenamiento como consecuencia del choque osmótico producido en la centrífuga AL al resuspender las células en agua dulce. Teniendo en cuenta que 1 mL de concentrado equivale aproximadamente a 200 mL de cultivo, el aporte de carbono orgánico total sería inferior al de añadir cultivo sin procesar. En el caso del concentrado elaborado con la centrífuga de Westfalia, éste sólo presentó en el medio $3,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbono orgánico. Esta diferencia probablemente se debió a que este concentrado, por su naturaleza arcillosa debido al alto contenido en sólidos, no se pudo normalizar al 10% p/v, como ocurre de forma automática en las centrífugas AL y F en la descarga.

La carga orgánica en el medio del concentrado F en T_0 es similar a la obtenida en ambos concentrados elaborados en el laboratorio, en torno a $11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig 3.2.2; capítulo 2.1) y es ligeramente inferior al concentrado AL, con $12,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, sugiriendo que este carbono orgánico no procede de la rotura celular debida al procesamiento con las centrífugas sino a la materia extracelular que ya se encuentra en los cultivos, probablemente exopolisacáridos (Ferreira, 2006) y al daño que se haga evidente tras la resuspensión por adición de agua para normalizar el concentrado a 10% p/v. También indica que las células se degradan durante el almacenamiento como consecuencia del choque osmótico producido en la centrífuga al resuspender las células en agua dulce. Teniendo en cuenta que 1 mL de concentrado equivale aproximadamente a 200 mL de cultivo, el aporte de carbono orgánico total sería inferior al de añadir cultivo sin procesar. En el caso del concentrado elaborado con la centrífuga Westfalia, éste sólo presentó en el medio $3,83 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbono orgánico. Esta diferencia probablemente se debió a que este concentrado no se vio sometido a degradación celular por resuspensión en agua de mar por el ajuste de concentración que sufrieron los concentrados procedentes de las demás centrífugas ya que, por su naturaleza arcillosa debido al alto contenido en sólidos, fue imposible de resuspender y el análisis de TOC tuvo que realizarse sobre el agua sobrenadante resultado de centrifugar 1 g.

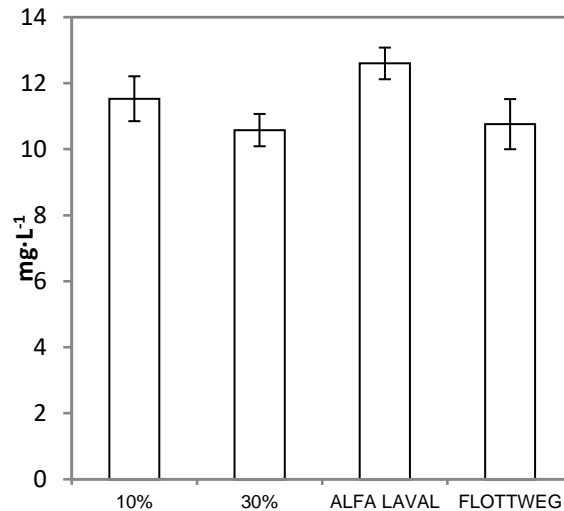


Fig. 2.2.2 Carbono Orgánico Total (TOC) medido en el medio resultante de centrifugar en equipamiento de laboratorio a 9000 g los concentrados elaborados con distintas centrífugas en T_0 . Se incorporan los valores obtenidos con centrífugas discontinuas sobre los cultivos en el capítulo 3.1 para facilitar su comparación.

Debido a que la resistencia a la reconstitución (Fig. 2.2.1) en el momento de la elaboración del concentrado (T_0) era mayor en los productos elaborados con la centrífuga Alfa Laval que con la Flottweg y tras los resultados similares de TOC, se decide realizar la optimización de los parámetros de centrifugación en la Alfa Laval.

Optimización de la centrífuga Alfa Laval

Con el objetivo de mejorar eficiencia de la centrífuga Alfa Laval y la calidad de los productos elaborados, se manipuló el tiempo de descarga de manera que se modificó el volumen de entrada de cultivo, manteniendo fijo el volumen de agua de descarga. De esta manera se elaboraron seis concentrados con distintas densidades.

Como el experimento anterior, el concentrado que se elaboró alimentando la centrífuga durante 20 minutos antes de producirla descarga, tiene una concentración de sólidos de 10% ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). La densidad celular es de $4 \cdot 10^9 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$, superior a la obtenida para estos mismos parámetros en el experimento anterior. Si bien, el cultivo tenía una densidad superior en el día de la elaboración de estos concentrados ($30,15 \cdot 10^6 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$).

La concentración de biomasa de los concentrados se incrementa de forma proporcional al tiempo de entrada de 1,12 a $4,65 \cdot 10^9 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, como se observa en la figura 3.2.3A. La densidad celular en el punto de 25 minutos no sigue la línea de progresión esperada probablemente debido a un error de pipeteo, pero la concentración de biomasa en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ es coherente con el incremento (Fig. 2.2.3).

Permitir la entrada de biomasa en la centrífuga durante más de 30 minutos no produjo una separación eficiente probablemente debido a la saturación de los discos, por lo que se observó la pérdida de células por el desagüe en el medio clarificado y no se realizaron concentrados con tiempos de alimentación de la centrífuga superiores a 30 min.

La resistencia a suspensión del concentrado elaborado tras 20 minutos de centrifugación coincide la obtenida en el experimento anterior (Figura 3.2.1A). Los concentrados elaborados centrifugando cultivo hasta 20 minutos no evidencia degradación celular tras

24 h reconstituidos a la concentración de trabajo y parece que el número de células resistentes a la reconstitución se estabilizó en torno a $3,2 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹ independientemente de la concentración inicial de las pastas, perdiendo el 21,5 % de las células el concentrado el de 30' (Fig 3.2.3B).

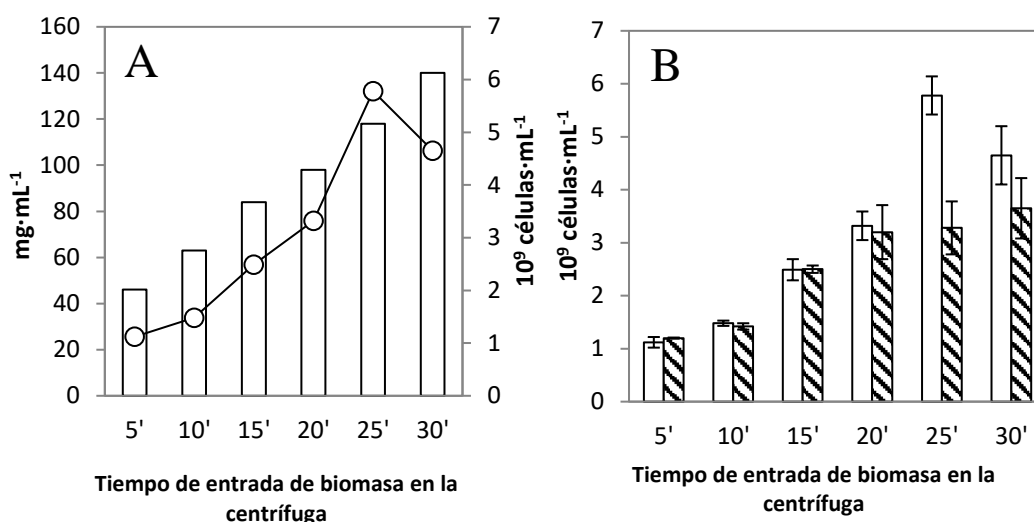


Fig. 2.2.3 Densidad celular (-o-) y concentración p/v (barras) de los preparados de *T. lutea* elaborados en la centrífuga continua Alfa Laval con diferente volumen de cultivo (A) y densidad celular de los concentrados (barra blanca) y tras resuspensión (barra rayada) de los concentrados (B).

La menor resistencia a la reconstitución en los productos más concentrados puede deberse a que las células, al pasar un mayor tiempo dentro de la máquina, se dañan por excesiva fricción o por elevada temperatura de la pasta al estar más tiempo en contacto con las láminas.

Hay que tener en cuenta que estos tiempos son aplicables a una biomasa de entrada que tenga la misma concentración de sólidos de partida. Si los cultivos a procesar tuvieran densidades celulares superiores o concentraciones de biomasa superiores, el tiempo de saturación de las láminas se reduciría. Por lo tanto, para normalizar la concentración de los productos elaborados habrá que tener en cuenta las variaciones, si las hubiere, de la concentración de cultivo. En cultivos continuos y semicontinuos en *steady-state*, la concentración no varía significativamente por lo que se simplificaría el tratamiento *downstream*.

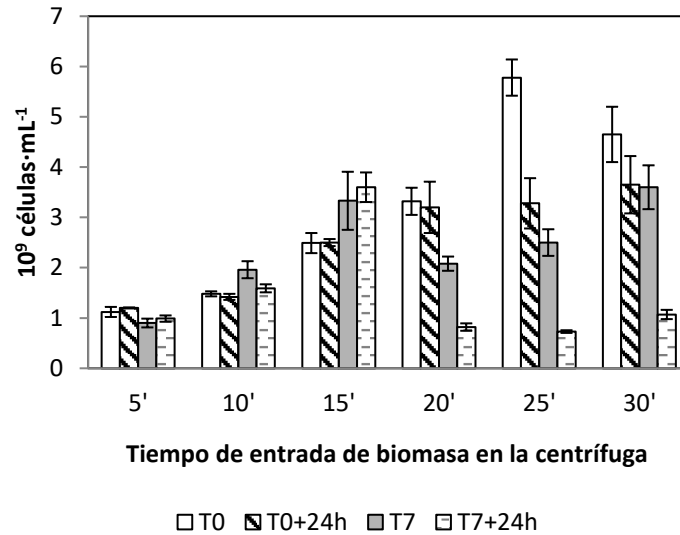


Fig. 2.2.4 Evolución de la densidad y resistencia a reconstitución de concentrados de *T. lutea* elaborados a partir de distintos volúmenes de cultivo y preservados durante 7 días a 4 °C.

Las pastas concentradas se preservaron a 4 °C durante una semana para estudiar su evolución. Sin embargo, hay que evaluar estos resultados con cautela, al haberse realizado la descarga con agua dulce (Fig. 2.2.4).

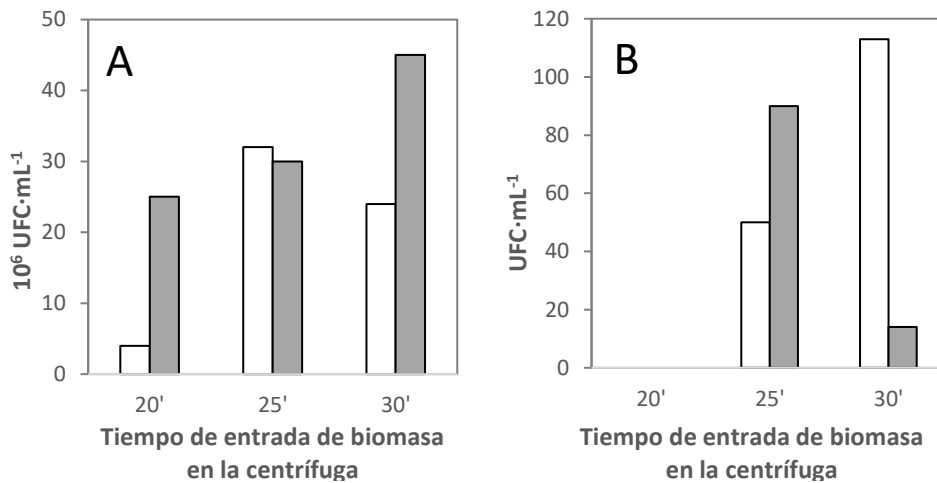


Fig. 2.2.5 Evolución del número de bacterias aerobias totales en TSA1 (A) y vibrios en TCBS (B) en concentrados de *T. lutea* elaborados a partir de distintos volúmenes de cultivo en el momento de elaboración de los concentrados T₀ (barras blancas) y tras siete días preservados a 4 °C T₇ (barras grises).

Tras siete días a 4 °C, los preparados elaborados introduciendo cultivo hasta 15 minutos en la centrífuga parecen no sufrir degradación celular. A partir de 20 minutos, todos los preparados presentan una densidad celular menor tras siete días. El porcentaje de células que sufren degradación es mayor en el concentrado elaborado a menos concentración (20 minutos) con un 37,58% frente a un 22,58% en concentrados tras 30 minutos (Fig. 2.2.4). Esto podría atribuirse a una mayor presión osmótica en los productos menos concentrados al realizarse la descarga con agua dulce. Sin embargo, los concentrados entre 5 y 15' están significativamente más diluidos y no sufren degradación celular durante la preservación, por lo que el daño celular parece estar asociado al tiempo de permanencia en la centrífuga.

La carga bacteria del cultivo en el fotobiorreactor el día de elaboración de los concentrados fue de $200 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ bacterias totales (en TSA-1) y $11 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ vibrios (en TCBS). El incremento del tiempo de bombeo de biomasa a la centrífuga hace incrementar el número de bacterias totales y vibrios en los concentrados. Sin embargo, en T_0 , con un factor de concentración de biomasa de 100x las bacterias solo se concentran 20x, con $4 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ bacterias totales para el concentrado en 20' y $24 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ para el concentrado en 30'. El valor obtenido para el concentrado en 25' es más alto de lo esperado, probablemente debido al error de pipeteo identificado previamente al utilizarse la misma dilución para el recuento microalgal y los recuentos bacterianos (Fig. 2.2.5A).

No se detectan vibrios en el concentrado durante 20' pero si a partir de 25'

Estos resultados difieren de los obtenidos en laboratorio en el capítulo 2, donde la carga bacteriana del cultivo de partida era inferior ($275 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) y donde se produce un descenso del número de bacterias durante el período de refrigeración y no se observan vibrios. Estas diferencias pueden deberse a que los cultivos industriales tienen una mayor carga bacteriana de partida y la temperatura que alcanzaron fue superior (35°C frente a 22°C en el laboratorio).

El incremento de la carga bacteria y los vibrios con el incremento del tiempo de centrifugación (Fig. 2.2.5) se explica porque el volumen centrifugado al elaborar los concentrados se incrementa proporcionalmente, separando un mayor número de bacterias junto con la biomasa microalgal.

Envasado con atmósferas protectoras

Para determinar el efecto de aplicar atmósferas protectoras a los concentrados de *T. lutea* sobre la integridad de las células y calidad microbiológica se aplicaron distintos gases utilizados en la industria alimentaria a pastas concentradas obtenidas centrifugando durante 20' biomasa de *T. lutea* en la centrífuga Alfa Laval. Los gases nitrógeno molecular N_2 , dióxido de carbono CO_2 y oxígeno O_2 se aplicaron mediante burbujeo directo en la biomasa recogida en un recipiente estéril y se compararon los resultados con un control sin tratar y un control aplicando aire.

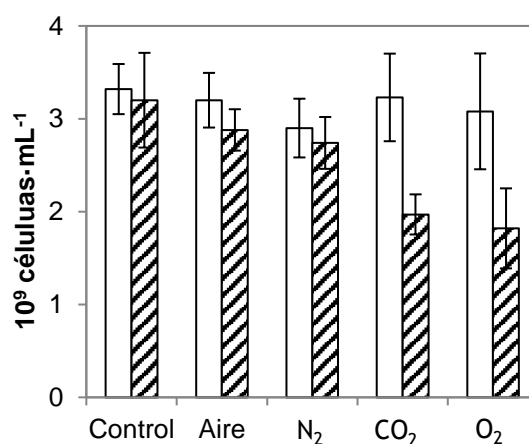


Fig. 2.2.6 Densidad celular (barras blancas) y resistencia a la reconstitución tras 24 h (barras rayadas) de concentrados preservados en distintas atmósferas protectoras inmediatamente después de su elaboración.

El empleo de distintos gases para generar una atmósfera protectora que incremente la durabilidad de los concentrados de *T. lutea* arrojó resultados variables, dependientes del gas empleado.

La densidad inicial de los concentrados antes de tratar con los gases es de $3.32 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹. Inmediatamente después del tratamiento, no se observa reducción en la densidad (Figura 2.2.6).

El daño producido por el burbujeo solo se revela tras 24 h de la reconstitución a volumen original en agua de mar. El burbujeo de aire produce una degradación del 9,72% de las células, similar al producido al utilizar nitrógeno (10,88%). Sin embargo, el burbujeo con CO₂ y O₂, que sí son químicamente reactivos, produce un daño celular no atribuible únicamente al daño físico producido por el tratamiento con un gas, con degradaciones celulares del 40,25% y 40,91% respectivamente, que probablemente se deban a la acidificación del medio en el caso de CO₂ y a la oxidación en el caso del oxígeno.

Esta degradación celular observada tras la resuspensión debida al burbujeo puede ser la responsable del incremento de bacterias aerobias con respecto al concentrado sin tratar ($8,5 \cdot 10^6$ frente a $4 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹, Fig. 2.2.7A).

En el caso de los concentrados preservados con N₂, una menor cantidad de bacterias con respecto al preservado con aire (-24,41%) parece indicar que la degradación celular por el burbujeo contribuye a generar materia orgánica, pero al excluir el oxígeno no todas las bacterias pudieron proliferar. Los concentrados preservados con CO₂ u O₂ muestran una carga bacteriana de aerobios totales un 50% inferior a la presente en el concentrado tratado con aire. Se confirmaría así que la interacción que produce degradación de las células de *T. lutea* también produce inhibición del crecimiento de bacterias.

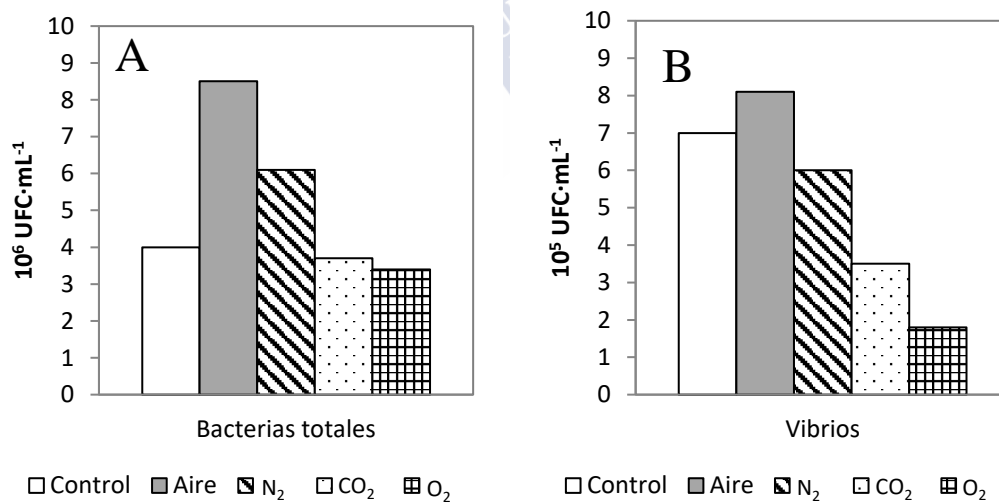


Fig. 2.2.7 Número de bacterias aerobias totales en TSA-1 (A) y vibrios en TCBS (B) en concentrados de *T. lutea* preservados con distintas atmósferas protectoras inmediatamente después del tratamiento.

En cualquier caso, la aplicación de una atmósfera inerte de nitrógeno gaseoso para prolongar la vida de los concentrados microalgales no mejora el control sin tratar para evitar el deterioro por crecimiento de microorganismos aerobios.

En el caso de los vibrios, el efecto del oxígeno sobre estas poblaciones es mucho mayor, reduciéndolas un 75% (Fig. 2.2.7B)

Tras 7 días todas las muestras estaban completamente degradadas probablemente debido a un incremento de la temperatura por un fallo en la cámara frigorífica de la Estación Experimental. Las bacterias totales aumentan entre 23 y 45 veces en todos los productos salvo los preservados con CO₂, indicando que este gas pudiera inhibir el crecimiento de bacterias, probablemente por acidificación (Fig. 2.2.8).

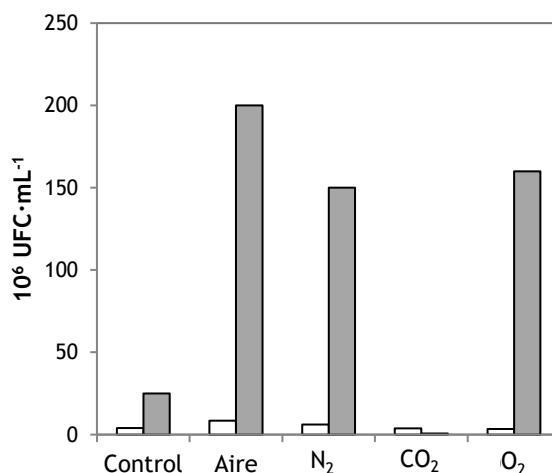


Fig. 2.2.8 Evolución del número de bacterias aerobias totales en TSA1 en concentrados de *T. lutea* en concentrados de *T. lutea* preservados con distintas atmósferas protectoras en el momento de la elaboración T₀ (barras blancas) y tras siete días preservados a 4 °C T₇ (barras grises)

Las microalgas son sensibles al efecto cizalla producido por el burbujeo de gases siendo las células de *T. lutea* especialmente sensibles a este efecto al no tener una pared celular definida (Liu & Lin, 2001). Este efecto ha sido estudiado principalmente en el contexto de burbujeo de aire en los fotobiorreactores y (Michels *et al.*, 2016; Wang & Lan, 2018) no en la exclusión de aire para someter a concentrados a una atmósfera diferente. La lisis celular se ha atribuido a la ruptura de la burbuja de gas al llegar a la superficie. Dependiendo del tamaño y la velocidad de la burbuja, se podría minimizar el daño, aunque llama la atención que con solo un minuto de burbujeo de aire en los concentrados ya se produce daño celular, por lo que sería conveniente estudiar otros métodos de aplicación de los gases.

El empleo de CO₂ es muy habitual en la preservación de frutas y verduras para disminuir la respiración de los productos (Sandhya, 2010) cuyo efecto protector se debe a la reducción del pH por la formación de HCO₃⁻, que reducirá la actividad enzimática o, simplemente, por inhibición de la oxidación por exclusión del O₂. Sin embargo, para que el CO₂ no tenga efecto deletéreo sobre el producto a preservar es necesario aplicar y mantener la concentración adecuada, que es variable dependiendo del producto y para la que no existen referencias en el caso de concentrados de *T. lutea*. El medio saturado de CO₂ empleado en el presente experimento pudo acelerar la degradación celular favoreciendo la aparición de procesos fermentativos (Sandhya, 2010).

Alkint *et al.* (2004) demostraron que el almacenamiento de zumo de zanahoria en atmósfera de CO₂, burbujeando en el producto, incrementó la vida media (definida por crecimiento microbiano) por disminución del número de bacterias, que atribuyó a la acidificación del producto. En este experimento, el uso de O₂ y N₂ sólo mejoraba ligeramente la durabilidad del producto y achacaba la mejora por inhibición del crecimiento de los aerobios y daño oxidativo general en la microbiota. Pero, en el

experimento con los concentrados de *T. lutea*, el CO₂ empeora la pérdida inicial de células, al igual que el O₂ (Fig. 3.2.6) aunque inhiban efectivamente la carga bacteriana.

Emplear otros métodos para reducir el pH como el ácido cítrico o el ascórbico, que además son antioxidantes, no parece mejorar la preservación frente a concentrados no tratados en *T. lutea* y *P. lutheri*, aunque sí en *S. costatum* (Heasman *et al.*, 2000).

En el caso del O₂, en el presente experimento se revela tan dañino para la microbiota como para las propias células microalgales a preservar, y generalmente se ha determinado que la oxidación es deletérea tanto para microalgas preservadas (Heasman *et al.*, 2000) como para productos alimentarios (Sandhya, 2010). Sin embargo, hay experiencias positivas donde no se revela degradación del producto y sí se aumenta la durabilidad (Alklint *et al.*, 2004), sugiriendo que el éxito de aplicar atmósferas protectoras va a depender tanto de las propiedades del producto a preservar como del sistema de aplicación de la atmósfera y la concentración final de ésta.

El contenido del presente capítulo, incluidas las figuras 2.1.1, 2.1.2 y 2.1.4, se ha reproducido parcialmente en el artículo "Impact of culture media and temperature on productivity and fatty acid profile of semicontinuous cultures of *Tisochrysis lutea*" enviado a la Revista *Algal Research* y pendiente de publicación. Autores: A. Cortina-Burgueño^a, G. Acién^b, A. González^c, M. Ferreira^d y A. Otero^a.

^a Instituto de Acuicultura y Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología. Edificio CIBUS, Campus Vida. Universidade de Santiago de Compostela. 15782. Santiago de Compostela. Spain.

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería, Almería, Spain.

^c Estación Experimental Las Palmerillas, Fundación Cajamar, Almería, Spain.

^d ANFACO-CECOPECA, Departamento de Acuicultura, Ctra. Colegio Universitario, 16, 36310 Vigo, Spain.



Capítulo 3 ELABORACIÓN DE PRODUCTOS BASADOS EN *T. lutea* PARA SU USO EN ACUICULTURA

INTRODUCCIÓN

Para facilitar el cultivo larvario y reducir los costes de producción en los criaderos, sería interesante disponer de un producto a partir de biomasa de *T. lutea* fácil de almacenar y dosificar, con larga durabilidad y que no pierda sus excelentes propiedades nutricionales. Con este fin, se aplican en la industria diversos métodos de cosechado y preservación. En acuicultura son muy populares los concentrados de microalgas preparados centrifugando la biomasa y refrigerándola entre 2 y 8 °C en un frigorífico convencional, así como la biomasa congelada y/o liofilizada, listas para su empleo en los criaderos.

Muchos preparados de microalgas han sido ensayados con éxito en distintos organismos. Por ejemplo, *M. gaditana* produce crecimiento comparable en rotífero, independientemente de ser suministrada fresca o liofilizada (Cañavate & Fernández-Díaz, 2001) y *Chaetoceros* (Ponis *et al.*, 2003; Ponis *et al.*, 2003) o concentrada y preservada a 4 °C (Ponis *et al.*, 2008) puede sustituir a la microalga fresca para *Crassostrea gigas*.

Esto no parece ser cierto para *T. lutea*, ya que, aunque hay indicios de que la preservación sin efectos deletéreos (Brown & Robert, 2002; Hidu & Ukeles, 1962), el estado del arte dista mucho de conocer las razones por las que un producto basado en *T. lutea* funciona o no, con múltiples fracasos en rotífero (Cañavate & Fernández-Díaz, 2001) moluscos (Albentosa *et al.*, 1997; Nell & O'Connor, 1991; Ponis *et al.*, 2003; Walne, 1979) y larvas de crustáceos (D'Souza *et al.*, 2000; Millamena & Aujero, 1978) y evidencias de que el procesado disminuye la calidad de la microalga, tanto en los procesos de concentración como de congelado y liofilización (Babarro *et al.*, 2001; Molina Grima *et al.*, 1994).

Algunos de los parámetros argüidos como responsables del daño celular en el procesamiento, y por tanto objetivo de optimización para conseguir un producto preservado de *T. lutea*, son la fuerza centrífuga (Heasman *et al.*, 2000), y la temperatura de congelación (Cañavate & Lubián, 1995a, b). Además, no hay referencias al efecto que el estado nutricional de las células pudiera tener sobre su resistencia al procesado.

Por todo ello, es interesante estudiar el efecto del estado nutricional de las células de *T. lutea* y la fuerza de centrifugación sobre su integridad celular y calidad tras el cosechado, tanto en condiciones controladas de laboratorio como semi-industriales.

Se espera que los cultivos sometidos a mayor Fuerza Centrífuga Relativa (RCF) disminuyan en mayor grado la viabilidad e integridad celular, que se traducirá en peor estabilidad en la columna de agua, mayor número de bacterias y mayor concentración de materia orgánica disuelta.

3.1 Elaboración de concentrados de *T. lutea* en condiciones controladas.

OBJETIVO

Definir en condiciones controladas de laboratorio el impacto del estado nutricional y/o la fuerza de centrifugación sobre el daño celular a la hora del cosechado con el fin de incrementar la durabilidad de productos concentrados de microalgas

DISEÑO EXPERIMENTAL

La microalga marina *T. lutea* CCMP 1324 se cultivó en botellones esféricos con fondo plano de 5L a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ sometidos a un régimen de luz:oscuridad 12h:12h, iluminados en un lateral y en la parte inferior, siendo la intensidad luminosa $200 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se burbujeó aire en los cultivos de forma continua, enriqueciendo con CO_2 en pulsos de 10'' cada 10' durante el período de luz para mantener el pH entre 7,6 y 7,8.

Se utilizó el medio de cultivo Algal (Fábregas *et al.*, 1984) a una concentración de 4 mM de NaNO_3 , descrito en *Material y Métodos*.

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $10,2 \pm 0,31 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase estacionaria temprana, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 10 y del 30% del volumen. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se prepararon dos productos concentrados distintos, centrifugando el mismo número de células. En un primer experimento se utilizaron tubos Falcon de 50 mL en una centrífuga basculante Kubota a 2.009 g (3.100 rpm) a 22°C y los *pellets* se combinaron en un recipiente de polietileno autoclavados, se normalizaron a 10% p/v y se preservaron a 4°C durante 30 días mientras que, en un segundo experimento, se empleó una centrífuga angular Hettick Universal a 9.418 g (9.000 rpm), a 4°C y la normalización a 10% p/v se realizó en el mismo tubo de centrífuga, que se preservó a 4°C durante 35 días. La normalización se realizó resuspendiendo los *pellets* en agua de mar filtrada y estéril para obtener una densidad final en el concentrado de $5,3 \cdot 10^9 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, que equivale aproximadamente a un 10% p/v.

A lo largo del período de conservación, se extrajeron muestras de los concentrados para analizar su integridad celular, estabilidad en la columna de agua, viabilidad y carga bacteriana mediante los protocolos detallados en *Material y Métodos*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los cultivos

Las diferentes tasas de renovación determinan dos estados fisiológicos distintos; El cultivo con tasa de renovación diaria del 10% (TR10%) consumió todo el nitrógeno disponible mientras que el cultivo con tasa de renovación diaria del 30% (TR30%), con nitrato aún disponible en el medio de cultivo, probablemente vio limitado su crecimiento por la disponibilidad de luz.

T. lutea, cultivada en botellones de 5 L, alcanzó menor densidad de equilibrio cuando se aplicó la TR30% ($20,48 \cdot 10^6$ frente a $24,04 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ con TR10%). El descenso de la densidad de equilibrio con el incremento de la tasa de renovación es una característica típica de los cultivos semicontinuos de microalgas (Fábregas *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Otero & Fábregas, 1997) y se pudo observar también en los fotobioreactores (Capítulo 2). Estas bajas densidades, incluso en la TR10%, comparando con los capítulos anteriores (siempre superiores a $60 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) se deben a la menor disponibilidad de luz efectiva por célula en este sistema de cultivo, ya que la relación superficie/volumen en los matraces de 5L es menor.

Debido a esta diferencia en la densidad de equilibrio y en la disponibilidad de luz y nutrientes, el peso celular disminuye con el incremento de la tasa de crecimiento ($21,71$ pg·célula⁻¹ con TR10% y $18,71$ con TR30%), fenómeno ya observado para esta misma especie (Ferreira *et al.*, 2008).

La viabilidad de las células, medida como actividad de enzimas esterazas, fue del 100% (no se muestran los datos) en ambos cultivos, indicando que ninguna célula tenía la membrana plasmática comprometida ni la actividad enzimática inhibida antes del cosechado.

Como era de esperar, el cultivo con menor tasa de renovación presenta, además, un mayor número de bacterias que aquel que renueva un mayor volumen diariamente ($8,6 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ en los cultivos sometidos al 10% de renovación diaria frente $1,47 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ en los sometidos al 30%), hecho que también se ha observado en cultivos semicontinuos con diferente tasa de renovación de *I. galbana*, *T. suecica*, *P. lutheri*, *S. costatum* y *Chaetoceros mülleri* (Salvesen *et al.*, 2000). La presencia de vibriónáceas resultó negativa tras analizar 600 µL en medio TCBS en ambas condiciones.

La razón de que la carga bacteriana sea menor en cultivos con mayor tasa de renovación puede ser la producción de moléculas extracelulares. Los cultivos limitados por nitrógeno, como es el caso del presente cultivo con TR10%, tienden a utilizar la producción de exopolisacárido como sistema para desviar el exceso de poder reductor generado por la fotosíntesis, que no puede utilizarse para el crecimiento (Ferreira, 2006). Los cultivos sometidos a TR30%, aunque reciban más luz por célula, disponen de nitrógeno, lo que permite un equilibrio entre los metabolismos de nitrógeno y carbono y presentarían menor excreción de exopolisacáridos que pudieran servir de fuente de carbono para las bacterias presentes en el cultivo (Fábregas *et al.*, 1998).

Efecto de la tasa de renovación y la fuerza de centrifugación en la calidad de concentrados de *T. lutea*

Centrifugación a 2.000 g

Cuando se centrifugó la biomasa a 2.000 g para preparar los concentrados, todas las células se sedimentaron tras 5 minutos de centrifugación. Tras la resuspensión en agua de mar estéril para alcanzar una concentración cercana al 10% p/v, se realizó un recuento para confirmar que la densidad celular no resultó afectada por el proceso de elaboración del concentrado (Fig. 3.1.1). La densidad teórica del concentrado teniendo en cuenta la densidad del cultivo y el volumen centrifugado era de $5,35 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹ pero tras, la centrifugación, la densidad del concentrado fue de $2,1 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹. Sin embargo, al observar las células al microscopio no se observaron células con bordes irregulares ni restos de células rotas, pero sí agregados celulares. Es posible que la resuspensión en agua

de mar para ajustar la concentración no fuese suficiente para obtener una consistencia homogénea y que el pipeteo del concentrado, altamente viscoso introdujese un error de recuento.

La actividad esterasa, que era del 100% en los cultivos sin procesar, disminuyó al 27,08% y 26,83% para TR10% y TR30% respectivamente tras centrifugar, indicando que la integridad de la membrana plasmática se había visto comprometida (Fig. 3.1.1A). Este factor pudo contribuir al deterioro del concentrado durante la etapa de conservación en frío. Heasman *et al.* (2000) observaron que centrifugando a 1.300 g en una centrífuga de laboratorio la viabilidad sigue siendo del 100% y a 13.000 g en una centrífuga industrial solo disminuye al 88%. Esta diferencia en los resultados podría deberse a la menor fuerza centrífuga aplicada en el primer caso o al empleo de una centrífuga continua en el segundo caso. Sin embargo, podría ser que en dicho experimento se cuantificaran como células viables aquellas que simplemente tienen la membrana plasmática íntegra, ya que el método empleado por Heasman *et al.* (2000) para cuantificar la viabilidad es la tinción por exclusión con azul de Evan. Esta técnica asocia viabilidad a la capacidad de las células de excluir el tinte sin tener en cuenta si aún existe actividad celular. En cualquier caso, disminuir la fuerza centrífuga a 1.300 g no permitió a Heasman *et al.* centrifugar todas las células presentes en el cultivo.

Tras 30 días de refrigeración a 4°C, el número de células íntegras observables al microscopio presentes en la pasta disminuyó en torno a un 19% frente a la densidad inicial, sin diferencias entre las tasas de renovación (Figura 3.1.1 B). Sin embargo, la actividad enzimática se redujo drásticamente al 5% en este periodo. Esto puede deberse a degradación de las células dañadas durante el proceso de elaboración de los concentrados, fenómeno común en *T. lutea* (Ponis *et al.*, 2003) o a un descenso de la actividad enzimática debido a la preservación a 4 °C. La rápida disminución de la viabilidad durante las dos primeras semanas de conservación ya se ha observado tanto en *T. lutea* (Ponis *et al.*, 2003) como en *Pavlova lutheri* (Ponis *et al.*, 2008). Otras especies, como *C. muelleri*, *C. calcitrans* y *Skeletonema sp.*, parecen conservar la viabilidad celular durante 7 semanas de refrigeración (Nunes *et al.*, 2009) incluso cuando se centrifuga a 13.000 g (McCauley *et al.*, 1999) sugiriendo que la presencia de una estructura extramembranal como una pared celular y/o una frústula de silicio, puede servir como protección frente a la degradación durante el procesamiento y/o almacenamiento. Por el contrario, *T. lutea* y *P. lutheri*, al carecer de pared celular definida (Liu & Lin, 2001; Zhu *et al.*, 1997) serían más sensibles a todo el proceso.

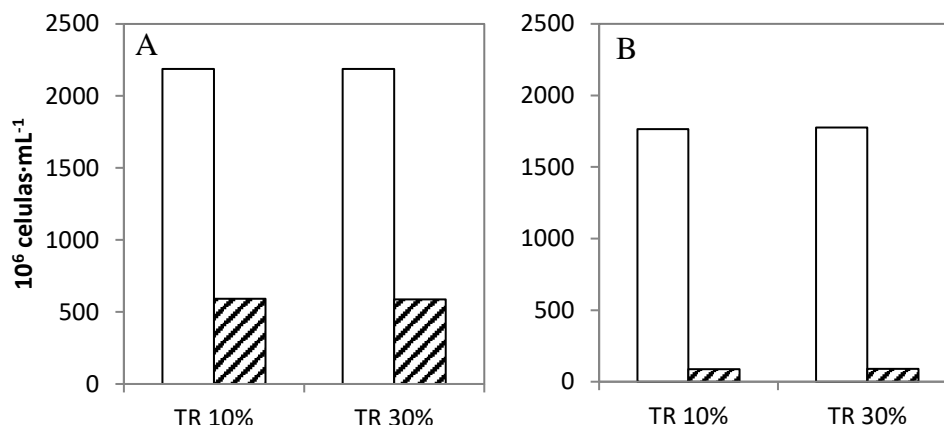


Fig. 3.1.1 Evolución de la densidad celular (barra blanca) y la viabilidad medida con acetato de fluoresceína (barra rayada) durante el período de conservación de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 2000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4 °C inmediatamente después de la preparación (A) y 30 días después (B)

Otro factor que podría afectar a la viabilidad durante la preservación a 4 °C es la densidad celular del concentrado. Molina-Grima *et al.* (1994) observaron que *I. galbana* conserva el 85% de la viabilidad tras 30 días a 4 °C cuando la densidad del concentrado era del 0,9% p/v, diez veces menor que en el presente experimento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en dicho experimento la centrifugación sometió a las células a una fuerza centrífuga menor (2.500 rpm, 686 g) que ha podido evitar el daño celular, y que el método utilizado para cuantificar la viabilidad fue el azul de Evan, que no determina si hay actividad celular, como ya se vio anteriormente. En cualquier caso, se quiso descartar el efecto de la densidad (p/v) de los concentrados sobre la resistencia celular, para lo cual se realizó un experimento cuyos resultados se discuten en la sección 2 del presente capítulo.

Para determinar la calidad de los concentrados, se resuspendieron en agua de mar estéril para obtener una densidad típica de cultivo. Una vez reconstituidos de la misma forma que se haría para ser suministrada en un criadero, se cuantificó el número de células inmediatamente después de la dilución y tras 24h, homogeneizando para volver a resuspender las células que se depositaron. De esta forma, se puede comparar la integridad celular inmediatamente después de elaborar el concentrado y tras estar 24 h diluido (Fig. 3.1.2). Las densidad de las muestras diluidas no solo no disminuyen, sino que aumentan ligeramente en ambas tasas de renovación (+5,1% en TR10% y +7,47% en TR30%) tras 24h, sugiriendo que después de 30 días a 4 °C las células están íntegras y activas como para permitir la división celular. Se observaron células móviles en muestras de ambos concentrados reconstituidos vistas al microscopio.

También se cuantificó el número de células que se mantuvieron en suspensión en la columna de agua 24h después de la dilución (Fig. 3.1.3). La persistencia en la columna de agua no se ve afectada fuertemente por la tasa de renovación empleada, depositándose el 29,7% de las células del concentrado TR10% y el 23,94% de TR30% tras 24h.

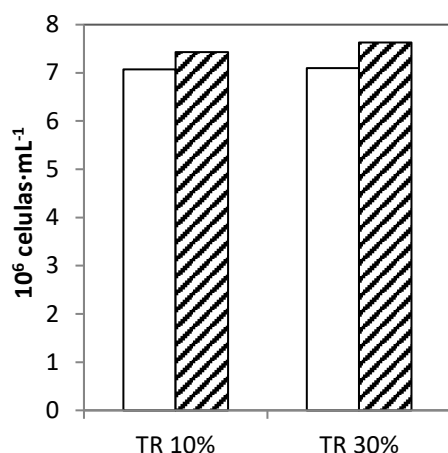


Fig. 3.1.2 Densidad celular de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 2000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4 °C durante 30 días. Inmediatamente después de la resuspensión (barra blanca) y 24 h después de la reconstitución (barra rayada) tras resuspensión.

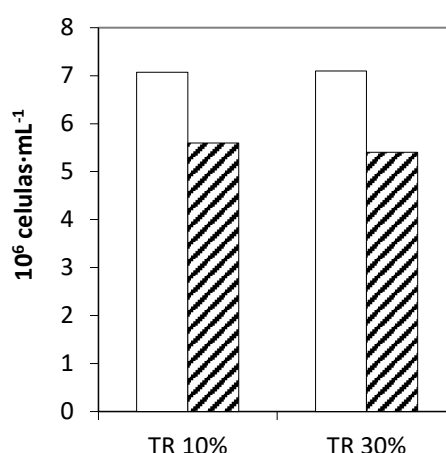


Fig. 3.1.3 Densidad celular en la capa superior de la columna de agua de concentrados reconstituidos elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 2000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4 °C durante 30 días. Inmediatamente después de la resuspensión (barra blanca) y 24 h después de la reconstitución (barra rayada)

En la elaboración del preparado se concentran las células de *T. lutea* 260,74 veces para el concentrado TR10% y 226,71 veces para el TR30%. Sin embargo, las células bacterianas presentes en el cultivo (8,6 y 1,47 UFC·mL⁻¹ para TR10% y TR30% respectivamente) no se concentran proporcionalmente. La centrifugación y posterior eliminación del sobrenadante elimina el 90% de las bacterias presentes, en el caso del concentrado TR10% ($T_0=210$ UFC·mL⁻¹) y el 92% en el TR30% ($T_0=28,4$ UFC·mL⁻¹) (Fig. 3.1.4). En cualquier caso, las bacterias que sí se centrifugan junto con las células de microalga, son concentradas al ser resuspendidas en un volumen menor y, como se observa en la biomasa de partida, la carga bacteriana en el concentrado elaborado con la biomasa cultivada con TR10% es superior a la de aquel cultivado con TR30% (Fig. 2.1.4).

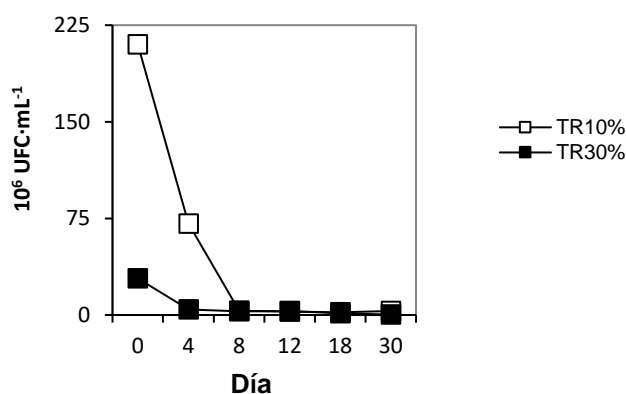


Fig. 3.1.4 Evolución de la carga bacteriana (bacterias aerobias totales) de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 2000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4°C durante 30 días.

Nunes *et al.* (2009) observaron que la centrifugación elimina la mayor parte de las bacterias presentes en los cultivos. Sin embargo, se percataron de que la densidad de las bacterias que permanecen no varía durante las 7 semanas de preservación a 4 °C. En el presente experimento, la refrigeración a 4 °C tiene un impacto positivo en la carga bacteriana de ambos concentrados, reduciéndose un 77,21% en 4 días en el caso del concentrado TR10% y un 84,29% en el caso de TR30%. Esta tendencia continuó durante todo el período de refrigeración, reduciéndose la carga bacteriana por debajo de $0,5 \cdot 10^6$ UFCs·mL⁻¹ de concentrado en ambos casos.

Centrifugación a 9.000 g

En el caso de los concentrados elaborados con la centrífuga a 9.000 g se pudieron realizar otras pruebas que permiten evaluar de forma más precisa la evolución de la calidad de los concentrados con el tiempo. Además de analizar la evolución de la densidad, la actividad enzimática como medidor de la viabilidad y la evolución de la carga bacteriana, el estudio del comportamiento en la columna de agua y el estudio de la resistencia celular tras 24 en resuspensión, se midió la evolución del carbono orgánico disuelto y el perfil de ácidos grasos. Estos parámetros son importantes para determinar el comportamiento de las células una vez suministradas en tanques de cultivo.

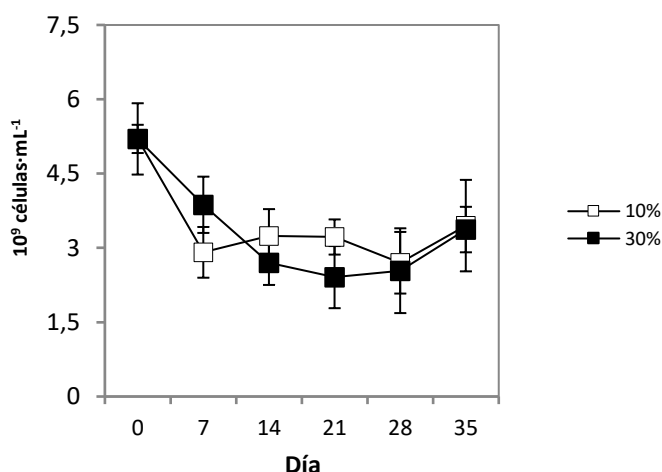


Fig. 3.1.5 Evolución de la densidad celular durante el período de conservación de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 9.000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4 °C.

La densidad celular de la pasta disminuyó durante el almacenamiento a 4 °C en ambos concentrados (Fig. 3.1.5). En el caso de la pasta elaborada con biomasa de TR10%, este descenso se produjo en la primera semana de conservación para mantenerse estable durante las 4 semanas restantes del experimento. El concentrado TR30%, sin embargo, sufre un descenso más paulatino, estabilizándose después de 15 días.

Esta disminución durante el periodo de almacenamiento es más acusada en estos concentrados elaborados a 9.000 g que en los elaborados a 2.000 g. Mientras los sometidos a menor fuerza centrífuga sufren una pérdida del 19% de las células en 30 días, sin diferencias entre la tasa de renovación aplicada para producir la biomasa, a 9.000 g se pierde un 39% de las células en los concentrados TR10% y casi el 50% de las células en el concentrado TR30%. Una mayor fuerza centrífuga parece provocar daño celular que se acusa durante el período de almacenamiento.

El análisis de la integridad celular, medida como la diferencia entre los recuentos tras la reconstitución del concentrado el día de su elaboración (T_0) a la densidad de trabajo típica de criadero (entre $5 \cdot 10^6$ y 10^7 células·mL⁻¹) y 24 h después, sugiere que las células del concentrado TR 30% parecen presentar mejor resistencia. Tras 24h, se observa que el 28,46% de las células se han dividido (Fig. 3.1.6 A). En el caso del concentrado TR10%, no se observa crecimiento en 24h, sugiriendo que las células estaban en peor disposición para dividirse, aunque tampoco se cuantifica un descenso en la densidad (Fig. 3.1.6B)

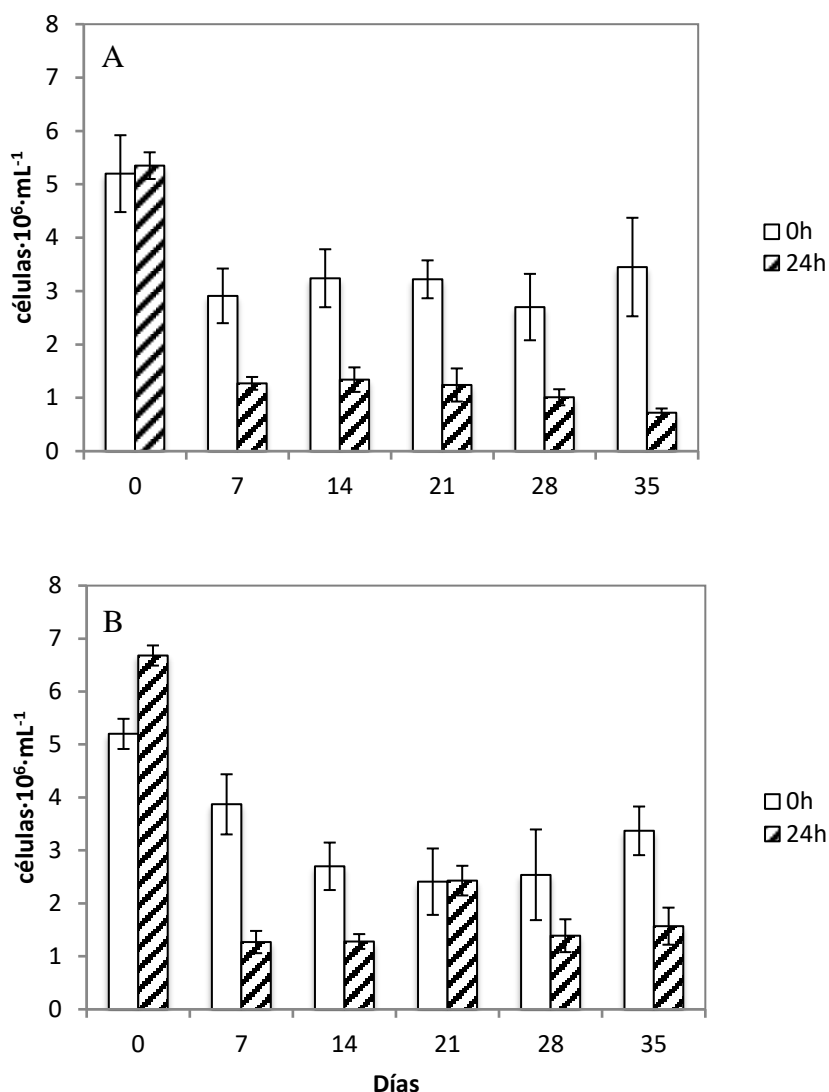


Fig. 3.1.6 Densidad celular de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% (A) y un 30% (B) de renovación diaria, centrifugados a 9.000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4 °C durante 35 días. Inmediatamente después de la resuspensión (barra blanca) y 24 h después de la reconstitución (barra rayada).

Tras 7 días refrigerados y 24h diluidas en agua de mar, las células de ambos concentrados parecen desintegrarse ya que el 53,36% en TR10% y el 67,18% en TR30% de las células desaparece. En las 3 semanas siguientes, en el caso del concentrado con TR10%, cada vez menos células persisten en el reconstituido tras 24 h, con una pérdida semanal de en torno a $0,3 \cdot 10^9$ cél·mL⁻¹ de concentrado. Sin embargo, en el caso de los concentrados TR30%, el número de células que persisten no disminuye.

Esto difiere con respecto a los resultados obtenidos con los concentrados elaborados a 2.000 g, que no presentan desintegración celular tras 30 días a 4 °C y 24 horas reconstituidos, sugiriéndose que 9.000 g producen daño que afecta a la integridad celular y las hace susceptibles a la desintegración una vez reconstituidos.

La actividad esterasa en ambas tasas de renovación fue del 30% tras elaborar la pasta teniendo un valor 0 tras 7 días. Aunque los resultados en el día de la elaboración de estos concentrados son iguales a los obtenidos en los elaborados a 2.000 g, cabe destacar que a 2.000 g aún había actividad esterasa tras una semana de almacenamiento, indicando que la centrifuga a 9.000 g tiene un efecto deletéreo.

Al igual que para los concentrados elaborados a 2.000, la centrifugación elimina en el sobrenadante parte de las bacterias presentes en el cultivo. En este caso, como la fuerza de centrifugación es mayor, el número de bacterias eliminadas es inferior: el 47,95% en el concentrado TR10% y el 25,47% en el concentrado TR30%. Por lo tanto, la carga bacteriana de partida en estos concentrados es superior a la de concentrados elaborados a 2.000 g (5,01 y 10,46 veces mayor en TR10% y TR30% respectivamente).

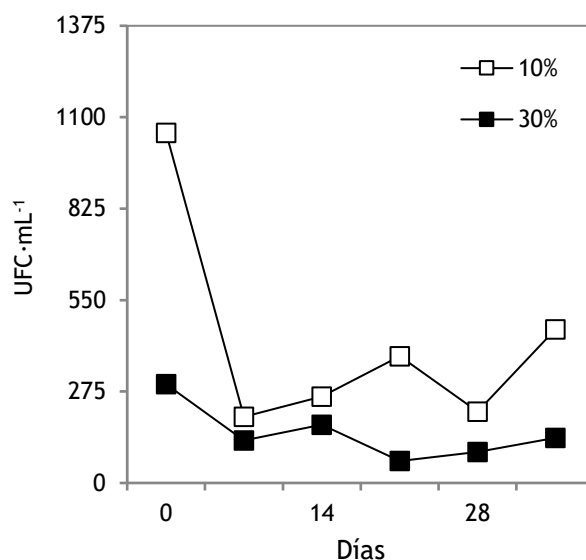


Fig. 3.1.7 Evolución de la carga bacteriana de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 9000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4°C durante 35 días.

Al igual que en los concentrados obtenidos a 2.000 g, la carga bacteriana se reduce drásticamente en la primera semana de conservación a 4 °C (Fig. 3.1.7) para el concentrado TR10%, disminuyendo un 87,84% con un ligero repunte a los 14 días. Igualmente, para el concentrado TR 30%, la carga bacteriana se reduce un 54,21% tras la primera semana para mantenerse hasta el final del experimento. Estos resultados concuerdan proporcionalmente con los obtenidos en los concentrados a 2.000 g, teniendo en cuenta que la carga bacteriana de partida es 100 veces superior en los concentrados a 9.000 g.

El análisis de carbono orgánico total medido en el sobrenadante tras centrifugar alícuotas de los concentrados a 9.000 g, es indicador de la cantidad de materia orgánica que se pudiera liberar como consecuencia de la degradación celular durante el periodo de conservación.

Inicialmente, la tasa de renovación de los cultivos con los que se elaboraron las pastas no parece influenciar la liberación de materia orgánica al medio, aunque se observa una tendencia en TR10% a incrementarse paulatinamente durante el periodo de conservación (de 10,57 a 13,02 mg·mL⁻¹) mientras que el concentrado TR30% permanece estable durante los primeros 21 días en torno a 10,3 mg·mL⁻¹, para incrementarse abruptamente en las últimas dos semanas al mismo nivel que TR10%. El descenso brusco para TR10% en la última semana a 9,19 mg·mL⁻¹ pudiera explicarse por el incremento en la carga bacteriana que sufrió esta pasta, pudiendo así consumir la materia orgánica disuelta.

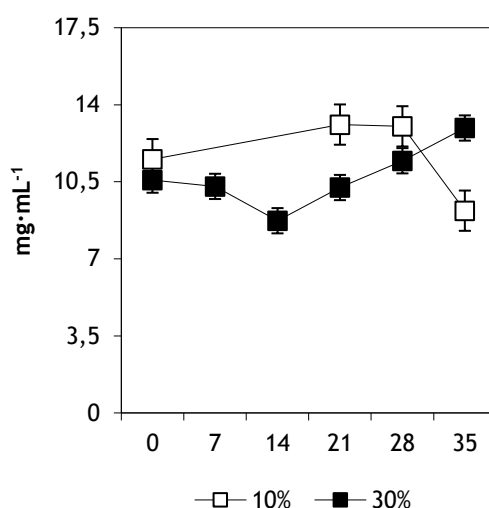


Fig. 3.1.8 Carbono orgánico total (TOC) medido en el sobrenadante de concentrados elaborados a partir de *T. lutea* cultivada con un 10% y un 30% de renovación diaria, centrifugados a 9.000 g, normalizados a 10% p/v y preservados a 4 °C

Como era de esperar, en el análisis de ácidos grasos se observan diferencias entre la biomasa cultivada con una TR10% y la cultivada con una TR30% (Tablas 3.1.1 y 3.1.2); como es habitual en cultivos semicontinuos, la biomasa cultivada con una tasa de renovación menor presenta un mayor contenido en ácidos grasos (3,54 vs 2,91 pg·cél⁻¹) debido a que las células presentan un peso mayor y un mayor contenido de lípidos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ferreira *et al.* (2011) para cultivos de *T. lutea* tratados con distintas tasas de renovación. Sin embargo, contrario a estos resultados, en los cultivos del presente experimento no existen diferencias entre las dos tasas de renovación para el porcentaje de ácidos poliinsaturados. Esto es debido a que, a pesar de que los ácidos grasos omega 3 de cadena larga (18:4 ω 3, 22:5 ω 6 y DHA) se presentan en porcentajes superiores, los ácidos grasos 18:3 ω 6 y n3 disminuyen sensiblemente para la TR30%. Se produce un incremento de ácidos grasos ω -3 del 25 al 31,80%. Se observa una disminución del porcentaje de los ácidos grasos monoinsaturados, como acontece típicamente en cultivos semicontinuos debido a que los cultivos están fuertemente limitados por luz en los botellones de 5 L (Otero & Fábregas, 1997), de 22,01% a 16,44%.

Los ácidos grasos más abundantes en ambos cultivos son el 14:0, 16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6 y 18:4 ω 3, como ya ha sido señalado por varios autores (Ferreira *et al.*, 2011; Sukenik & Wahnnon, 1991; Volkman *et al.*, 1989).

Los porcentajes de ácidos grasos son similares a los obtenidos por Ferreira (2006) para ambas tasas de renovación, cultivando sin embargo con una intensidad luminosa mucho mayor, 162 μ mol fotones·m⁻²·s⁻¹ para fotobioreactores de 3 cm de diámetro frente a 200

$\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para botellones de 25 cm de diámetro. El descenso de los ácidos grasos 16:0 y 18:1 con el incremento de la tasa de renovación y el incremento del 18:4 ω 3 y el DHA también fue observado por Ferreira (2006) y por Sukenik & Wahnnon (1991) y se justifica por ser 16:0 y 18:1 ácidos grasos presentes en lípidos neutros de reserva, que disminuyen con el incremento de la tasa de crecimiento en favor de los ácidos grasos presentes en los lípidos estructurales (de membrana), como son el 18:4 ω 3 y el DHA. Sin embargo, el efecto observado en el presente experimento es menor debido a la menor irradiancia de estos sistemas de cultivo frente a los tubos de 3 cm de diámetro de Ferreira (2006), lo que pone de manifiesto la importancia de disponer de sistemas altamente eficientes para la producción de biomasa de elevada calidad.

En lo referente a la degradación de los ácidos grasos durante el periodo de conservación a 4 °C, en ambos concentrados se produce degradación del contenido total, siendo ésta más acusada en el concentrado elaborado con biomasa TR30%. Para el concentrado TR10% se produce una pérdida del 32,2% del contenido total y, aunque se produce degradación en todos los ácidos grasos, los que mayor pérdida sufren son el 14:0 y el 18:0 con un 40,37 y 42,91%, respectivamente. Montaini *et al.* (1995) observaron una tendencia similar en la degradación de ácidos grasos en concentrados de *T. suecica* y justificaron la mayor degradación en 14:0 y 18:0 por formar parte estos de lípidos de reserva, que se consumirían como consecuencia de actividad celular residual (Fig. 3.1.9A).

Los ácidos grasos poliinsaturados 18:3 ω 3 y 18:4 ω 3 sufren una pérdida algo menor, en torno al 32% y el DHA, del 25%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para un concentrado de *I. galbana* preservado a 4 °C durante 30 días (Molina Grima *et al.*, 1994) donde el contenido de ácidos grasos descendió con el tiempo y la pérdida total para el DHA fue del 24,21%. Así mismo, Ponis *et al.* (2008) constataron pérdidas similares en el contenido de ácidos grasos (30%) para *P. lutheri* proporcionales en todos los ácidos grasos tras 23 días de preservación a 4°C.

Para el concentrado TR30% (Fig. 3.1.9B), la degradación de ácidos grasos durante el periodo de conservación es aún más dramática, perdiéndose el 62,2% del contenido total. En este caso los ácidos grasos más afectados son los poliinsaturados, con pérdidas superiores al 71% en todos ellos (Tabla 3.1.2, Fig. 3.1.9B).

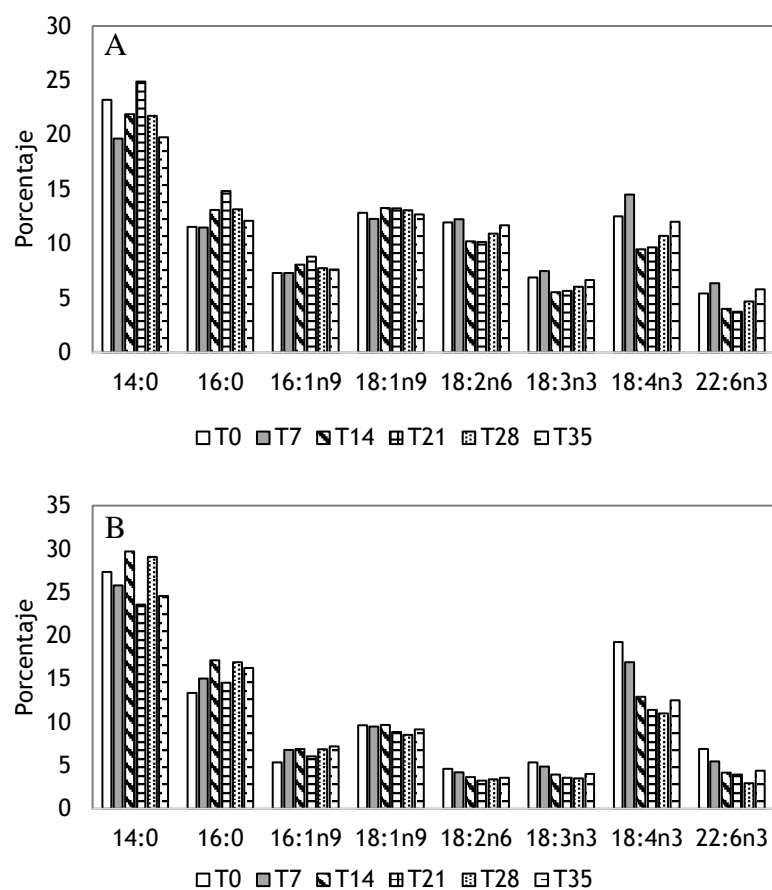


Fig. 3.1.9 Evolución del perfil de ácidos grasos de concentrado de *T. lutea* preparado con biomasa cultivada con una tasa de renovación del 10% (A) y del 30% (B), centrifugada a 9.000 g y preservada a 4°C durante 35 días.

Tabla 3.1.1 Evolución del perfil de ácidos grasos de *T. lutea* cultivada con una tasa de renovación del 10%, centrifugada a 9.000 g, resuspendida al 10% p/v y preservada a 4 °C durante 35 días.

Ácido graso	Días						14						21						28						35					
	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%								
14:0	0,84	23,21	1,30	19,66	0,38	21,90	1,15	24,90	0,63	21,73	0,50	19,77																		
15:0	0,01	0,34	0,03	0,48	0,01	0,70	0,03	0,58	0,01	0,39	0,01	0,38																		
16:0	0,42	11,54	0,76	11,47	0,23	13,10	0,69	14,83	0,38	13,14	0,31	12,11																		
16:1n9	0,27	7,30	0,48	7,30	0,14	8,07	0,41	8,80	0,22	7,73	0,19	7,64																		
18:0	0,03	0,86	0,05	0,76	0,01	0,84	0,06	1,20	0,02	0,79	0,02	0,70																		
18:1n9	0,47	12,82	0,81	12,27	0,23	13,27	0,61	13,23	0,38	13,05	0,32	12,69																		
18:1n7	0,07	1,88	0,12	1,75	0,04	2,02	0,10	2,08	0,06	2,01	0,05	1,99																		
18:2n6	0,43	11,94	0,81	12,25	0,18	10,21	0,47	10,14	0,32	10,91	0,30	11,68																		
18:3n6	0,06	1,64	0,12	1,85	0,02	1,34	0,06	1,34	0,04	1,48	0,04	1,66																		
18:3n3	0,25	6,88	0,49	7,48	0,10	5,52	0,26	5,66	0,17	6,02	0,17	6,65																		
18:4n3	0,45	12,50	0,96	14,52	0,17	9,47	0,45	9,65	0,31	10,72	0,31	12,00																		
20:5n3	0,01	0,21	0,02	0,32	0,00	0,13	0,00	0,00	0,01	0,18	0,01	0,29																		
22:5n6	0,03	0,81	0,06	0,93	0,01	0,62	0,02	0,50	0,02	0,73	0,02	0,94																		
22:6n3	0,20	5,41	0,42	6,36	0,07	4,00	0,17	3,74	0,14	4,69	0,15	5,80																		
TOTAL	3,54		6,42		1,60		4,46		2,70		2,40																			
Saturados	1,31	35,96	2,13	32,37	0,64	36,55	1,92	41,50	1,04	36,05	0,84																			
Monoinsaturados	0,80	22,01	1,41	21,32	0,41	23,35	1,11	24,11	0,66	22,79	0,57																			
Poliinsaturados	1,43	39,39	2,88	43,70	0,55	31,30	1,43	31,02	1,00	34,75	0,99																			
ω3	0,91	25,00	1,89	28,68	0,33	19,12	0,88	19,05	0,63	21,63	0,63																			
ω6	0,52	14,39	0,99	15,03	0,21	12,17	0,55	11,98	0,38	13,12	0,36																			
ω3/ ω6	1,74		1,91		1,57		1,59		1,65		1,73																			
PUFAS/SAT	1,10		1,35		0,86		0,75		0,96		1,18																			

Tabla 3.1.2 Evolución del perfil de ácidos grasos de *T. lutea* cultivada con una tasa de renovación del 30%, centrifugada a 9.000 g, resuspendida al 10% p/v y preservada a 4 °C durante 35 días.

Ácido graso	Días																	
	0		7		14		21		28		35							
	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel	%
14:0	0,82	27,33	0,48	25,79	0,74	29,72	0,24	23,56	0,41	29,07	0,27	24,56						
15:0	0,01	0,31	0,01	0,34	0,01	0,38	0,00	0,37	0,01	0,38	0,00	0,35						
16:0	0,40	13,38	0,28	15,03	0,43	17,15	0,15	14,54	0,24	16,94	0,18	16,24						
16:1n9	0,16	5,36	0,13	6,79	0,17	6,92	0,06	6,04	0,10	6,85	0,08	7,20						
18:0	0,04	1,25	0,02	1,33	0,04	1,41	0,01	1,38	0,02	1,35	0,02	1,79						
18:1n9	0,29	9,63	0,18	9,49	0,24	9,67	0,09	8,86	0,12	8,52	0,10	9,14						
18:1n7	0,04	1,44	0,03	1,42	0,04	1,63	0,02	1,55	0,03	1,79	0,02	2,22						
18:2n6	0,14	4,62	0,08	4,19	0,09	3,64	0,03	3,24	0,05	3,38	0,04	3,59						
18:3n6	0,02	0,68	0,01	0,66	0,01	0,55	0,00	0,48	0,01	0,47	0,01	0,53						
18:3n3	0,16	5,33	0,09	4,88	0,10	3,93	0,04	3,57	0,05	3,49	0,04	4,03						
18:4n3	0,58	19,24	0,31	16,91	0,32	12,93	0,12	11,40	0,16	11,01	0,14	12,52						
20:5n3	0,01	0,32	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
22:5n6	0,03	0,99	0,01	0,61	0,01	0,42	0,01	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00						
22:6n3	0,21	6,91	0,10	5,46	0,10	4,18	0,04	3,95	0,04	2,96	0,05	4,37						
TOTAL	2,91		1,73		2,30		0,80		1,23		1,10							
Saturados	1,27	42,28	0,79	42,49	1,21	48,67	0,40	39,86	0,68	47,74	0,47	42,94						
Monoinsaturados	0,49	16,44	0,33	17,71	0,45	18,21	0,17	16,46	0,24	17,16	0,20	18,56						
Poliinsaturados	1,14	38,09	0,61	32,86	0,64	25,66	0,23	23,14	0,30	21,31	0,28	25,05						
ω3	0,96	31,80	0,51	27,40	0,52	21,05	0,19	18,92	0,25	17,46	0,23	20,93						
ω6	0,19	6,29	0,10	5,46	0,11	4,62	0,04	4,22	0,05	3,85	0,05	4,12						
ω3/ ω6	5,06		5,01		4,56		4,48		4,54		5,08							
PUFAS/SAT	0,90		0,77		0,53		0,58		0,45		0,58							

3.2 Efecto del procesamiento de *T. lutea* sobre el crecimiento del rotífero *B. plicatilis*.

OBJETIVO

Identificar los parámetros de cultivo (tasa de renovación), cosechado (fuerza centrífuga) y preservación (temperatura de congelación y contenido de agua) que permiten obtener productos concentrados, congelados a distintas temperaturas y liofilizados a partir de biomasa de *T. lutea*, conservando las características nutricionales que garantizan su viabilidad para el cultivo de rotífero.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La microalga marina *T. lutea* CCMP 1324 se cultivó en botellones esféricos con fondo plano de 5 L a 22 ± 1 °C sometidos a un régimen de luz:oscuridad 12h:12h, iluminados en un lateral y en la parte inferior, siendo la intensidad luminosa $200 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se burbujó aire en los cultivos de forma continua, enriqueciendo con CO₂ en pulsos de 10'' cada 10' durante el período de luz para mantener el pH entre 7,6 y 7,8.

Se utilizó como medio de cultivo Algal (Fábregas *et al.*, 1984) a una concentración de 2,5 mM de NaNO₃, descrito en *Material y Métodos*. Se decidió reducir la concentración de nutrientes con respecto a la sección anterior (4 mM) para asegurar la limitación por nitrógeno en el cultivo con tasa de renovación del 10% sin limitar los cultivos con tasa de renovación del 30% una vez alcanzado el estado de equilibrio, ya que en el experimento previo, en una ocasión, quedó 0,1 mM de nitrógeno residual en el medio del cultivo TR 10% y en el cultivo TR 30% la concentración en el medio de cultivo cosechado fue de 2,02 mM diariamente.

Los cultivos se iniciaron con una densidad de $10,2 \pm 0,31 \cdot 10^6$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase estacionaria temprana, momento en el cual se sometieron a una renovación diaria del 10% y del 30% del volumen. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se utilizó la biomasa para elaborar los productos concentrados con una centrífuga Beckman, de mayor capacidad que en la sección anterior (1L).

En un primer experimento se constató el efecto sobre las células, sometidas a 10% y 30% de renovación diaria, a las mismas fuerzas centrífugas relativas (RFC) que en la sección 2.1, 2.000 g y 9.000 g, a 4 °C durante 5 minutos. Seguidamente se realizó un experimento para analizar el efecto de la tasa de renovación y la concentración celular del preparado sobre la integridad celular. Por último, se analizó el efecto de diferentes tipos de conservación (refrigeración, congelación y liofilización) sobre las células. Se realizó un análisis del valor nutricional de *T. lutea* para rotífero con la biomasa procesada con los mejores parámetros de cada sistema de conservación.

Se calcularon los volúmenes a centrifugar necesarios para obtener la concentración de biomasa requerida para cada experimento a partir de la densidad y peso seco del cultivo sometido a la tasa de renovación del 30%. Se centrifugó 5 minutos el mismo número de

células para ambos cultivos y se normalizó el volumen para alcanzar la concentración final con agua de mar estéril.

Para estudiar la resistencia celular a los parámetros elegidos en cada experimento, se diluyeron alícuotas de los productos elaborados a la concentración inicial del cultivo con agua de mar estéril y se realizó un recuento celular inmediatamente después de la dilución y tras 24h. Las condiciones de los tres experimentos se resumen a continuación:

Experimento 1. Verificación de los resultados de la sección 2.1.

Se constató el efecto de una centrífuga de mayor capacidad sobre las células, sometidas a 10% y 30% de renovación diaria, con las mismas fuerzas centrífugas relativas (RFC) que en la sección 2.1, 2.000 g y 9.000 g, a 4 °C durante 5 minutos. Tratamientos: TR10%-2.000 g, TR30%-2000 g, TR10%-9.000 g y TR30%-9.000 g

Experimento 2. Determinación del efecto de la tasa de renovación y la concentración celular del preparado sobre la integridad celular.

Se calcularon las concentraciones celulares necesarias para obtener una concentración de biomasa de 10%, 20% y 30% p/v (100, 200 y 300 mg·mL⁻¹ respectivamente) con el cultivo sometido a la tasa de renovación del 30%. Se centrifugó a 2.000 g, a 4 °C durante 5 minutos, el mismo número de células para ambos cultivos y se normalizó el volumen para alcanzar la concentración final con agua de mar estéril.

Tratamientos TR10%-10%p/v, TR10%-20%p/v, TR10%-30%p/v

TR30%-10%p/v, TR30%-20%p/v, TR30%-30%p/v

Experimento 3. Determinación del efecto de la tasa de renovación, la centrifugación, la concentración celular, la congelación y la liofilización sobre la integridad celular.

Se centrifugaron a 2.000 g, a 4 °C durante 5 minutos, 20 alícuotas de los cultivos de TR10% y 30%. La mitad de las alícuotas se procesó sin resuspender, obteniendo una concentración del 90% p/v, y la otra mitad se resuspendió en agua de mar estéril para obtener una densidad final en el concentrado de $5,3 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹, que equivalen aproximadamente a un 10% p/v para los productos elaborados con el cultivo TR30%. Un tercio de las alícuotas de los concentrados al 90% y 10% p/v se refrigeró a 4°C, un tercio se congeló a -20 °C y el tercio restante se congeló a -80 °C. La mitad de las alícuotas congeladas a cada una de las temperaturas mencionadas se liofilizó y la otra mitad se mantuvo en congelación hasta su posterior análisis.

Tras los distintos procesos de preservación, los productos resultantes se diluyeron al volumen original (equivalente a la densidad del cultivo) para comprobar la resistencia celular inmediatamente después de la diluidos y tras 24 horas reconstituidos.

Los productos que mostraron mejores resultados se probaron, junto con biomasa fresca sin procesar, en el rotífero *Brachionus plicatilis*. El cultivo de rotífero se realizó en botellas de 1 L con una densidad inicial de 50 rotíferos·mL⁻¹ alimentados diariamente con 30.000 células de *T. lutea* por rotífero durante 7 días, como se describe en la sección *Material y Métodos*.

Tabla 3.2.1 Características de los productos elaborados a analizar

Muestra	TR	Concentración p/v	Temperatura de conservación	Método de preservación	Tiempo desde elaboración hasta análisis
1	10%	90% (pellet)	+4°C	Refrigerado	0 días
2	10%	90% (pellet)	-20°C	Congelado	7 días
3	10%	90% (pellet)	-20°C	Liofilizado	7 días a -20°C hasta liof. y anál.
4	10%	90% (pellet)	-80°C	Congelado	7 días
5	10%	90% (pellet)	-80°C	Liofilizado	7 días a -80°C hasta liof. y anál.
6	10%	10% (pasta)	+4°C	Refrigerado	0 días
7	10%	10% (pasta)	-20°C	Congelado	7 días
8	10%	10% (pasta)	-20°C	Liofilizado	7 días a -20°C hasta liof. y anál.
9	10%	10% (pasta)	-80°C	Congelado	7 días
10	10%	10% (pasta)	-80°C	Liofilizado	7 días a -80°C hasta liof. y anál.
11	30%	90% (pellet)	+4°C	Refrigerado	0 días
12	30%	90% (pellet)	-20°C	Congelado	7 días
13	30%	90% (pellet)	-20°C	Liofilizado	7 días a -20°C hasta liof. y anál.
14	30%	90% (pellet)	-80°C	Congelado	7 días
15	30%	90% (pellet)	-80°C	Liofilizado	7 días a -80°C hasta liof. y anál.
16	30%	10% (pasta)	+4°C	Refrigerado	0 días
17	30%	10% (pasta)	-20°C	Congelado	7 días
18	30%	10% (pasta)	-20°C	Liofilizado	7 días a -20°C hasta liof. y anál.
19	30%	10% (pasta)	-80°C	Congelado	7 días
20	30%	10% (pasta)	-80°C	Liofilizado	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la tasa de renovación y la fuerza de centrifugación en la calidad de concentrados de *T. lutea*

Las densidades de los cultivos en el momento de la elaboración de los concentrados fueron de $33,13 \pm 1,08$ y $23,52 \pm 1,82 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ para las tasas de renovación 10% y 30% respectivamente. Estas densidades son mayores a las alcanzadas por los cultivos utilizados en la sección anterior ($24,04$ y $20,48 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ respectivamente) en iguales condiciones de cultivo, probablemente por un mejor control del pH. El peso celular, por tanto, fue menor en el presente experimento, de $20,49$ pg·célula⁻¹ con TR10% y $16,89$ pg·célula⁻¹ con TR30% frente a $21,71$ y $18,71$ pg·célula⁻¹ del experimento anterior. A la hora de normalizar los concentrados al 10% p/v en los cultivos de TR30% manteniendo el número de células centrifugadas del cultivo TR10%, los concentrados del presente experimento tienen una densidad (teórica) inicial de $5,93 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹.

Como ya se ha observado en la sección 2.1, la fuerza de centrifugación empleada para separar la biomasa del medio tiene un impacto negativo sobre la integridad de las células de *T. lutea* (Fig. 2.2.1). En el caso de los concentrados elaborados a 2.000 g, se produce una pérdida del 12% y 20% de las células para la biomasa cultivada a TR10% y 30% respectivamente. En la sección anterior se observó una caída brusca de la densidad (-60,75%) tras centrifugar con respecto a la densidad teórica, que se atribuyó a un error en la cuantificación (pipeteo 100 µL de pasta con elevada viscosidad) más que a la degradación celular. En el presente experimento, para evitar ese error se reconstituyó en el mismo recipiente donde se centrifugó por lo que la pérdida de células es menor y únicamente atribuible al proceso de centrifugación y reconstitución.

A 9.000 g, sin embargo, la pérdida de células es para ambas tasas de renovación de un 45 %. Esta diferencia no se observó inicialmente en la sección anterior, pero se hizo aparente a partir del séptimo día de refrigeración a 4 °C y pudiera estar relacionada con un mayor volumen centrifugado, aunque la centrífuga esté operada a la misma fuerza centrífuga relativa (RFC), tiempo y temperatura que en el apartado anterior. En cualquier caso, se confirma que a 9.000 g las células sufren mayor degradación celular que a 2.000 g.

Para ambas RFC y tasas de crecimiento la resistencia celular tras 24 h reconstituidas a volumen de cultivo en agua de mar estéril es del 100%, confirmando los resultados obtenidos en el apartado 2.1.

A la vista de los resultados obtenidos tanto en el apartado 2.1 como en el presente experimento, se decide utilizar 2.000 g para preparar los concentrados de los subsiguientes experimentos, con el fin de minimizar el daño celular en el primero paso del procesado.

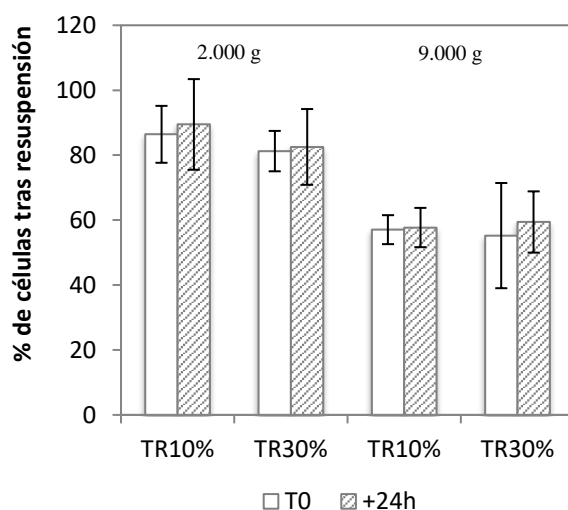


Fig. 2.2.1 Efecto de la tasa de crecimiento y la fuerza de centrifugación sobre la resistencia celular de *T. lutea*

Efecto de la tasa de renovación, y la concentración (p/v) en la calidad de productos concentrados de *T. lutea*

Para cuantificar el efecto de la concentración sobre la resistencia celular, se centrifugaron cultivos sometidos a tasas de renovación del 10 y 30% a 2.000 g y la concentración de biomasa se normalizó al 10%, 20% y 30% p/v con agua de mar estéril. Para los cultivos de TR30%, el cálculo del volumen a centrifugar se realizó, manteniendo el número de células centrifugadas del cultivo TR10%, por lo que éstos tienen una densidad (teórica) inicial de $5,93$, $11,94$ y $17,92 \cdot 10^9$ células·mL⁻¹ respectivamente.

El recuento de la densidad de los concentrados tras dilución se realizó como en la sección 2.1, pipeteando una alícuota del concentrado en lugar de reconstituyendo en el mismo recipiente, por lo que la densidad inicial de los concentrados cae en todas las condiciones de trabajo con respecto a la densidad teórica (Fig. 3.2.2) sin que se aprecie daño ni restos celulares tras la observación al microscopio. Parece haber un descenso más acusado de la densidad celular en las pastas de más concentración, pero no se pudo determinar si fue

por el error de pipeteo, debido a mayor viscosidad, o por efecto deletéreo de la concentración.

Igualmente, parece que los concentrados al 20% y 30% elaborados con biomasa de TR30% sufren un descenso menor de la densidad (en torno a un 6% menos) que los procedentes de cultivos con TR10%

Tras 24h de reconstitución a volumen de cultivo con agua de mar estéril, se observa no sólo mantenimiento de la densidad sino también un ligero crecimiento (sin diferencias significativas, $p > 0,05$), salvo en el grupo TR30%-30% p/v, lo que refuerza la hipótesis de que *T. lutea* no sufrió daño celular tras la centrifugación en ninguna de las condiciones.

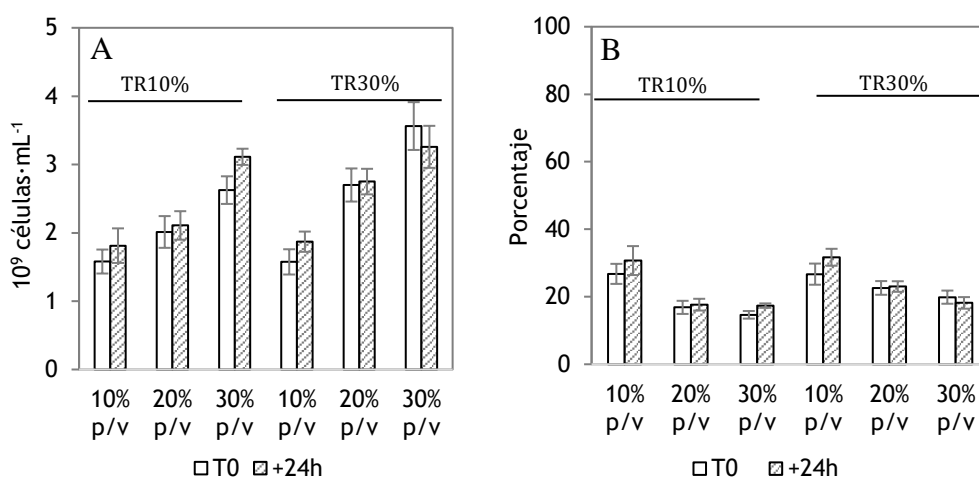


Fig. 3.2.2 Efecto de tasa de renovación de los cultivos y la concentración de biomasa sobre la concentración celular del concentrado en células·mL⁻¹ (A) y porcentaje sobre densidad teórica inicial (B), justo después de la preparación y 24 horas más tarde.

Efecto de la tasa de renovación, la temperatura de congelación y la concentración (p/v) en la calidad de productos congelados de *T. lutea*

Con el fin de constatar el efecto de la temperatura de congelación y la concentración de sólidos sobre la resistencia celular, se centrifugaron cultivos sometidos a tasas de renovación del 10 y 30% a 2.000 g, la mitad de los concentrados se normalizó a 10% p/v con agua de mar y la otra mitad se dejó en forma de *pellet* (90% p/v). La mitad de cada lote se congeló a -20 °C y la otra mitad a -80 °C. Tras una semana, los concentrados congelados se descongelaron a 21°C y se diluyeron en agua de mar para recuperar la densidad original del cultivo y verificar la resistencia celular.

La biomasa tras centrifugar a 2.000 g y congelar sufre degradación celular dependiente de la temperatura de congelación y la concentración celular que presente el concentrado (Fig. 3.2.3).

El aspecto de las muestras procedentes de cultivos de TR30% fue siempre mejor que el de las muestras TR10% tanto en la forma de las células como en la presencia de restos celulares.

La observación al microscopio de las células de los *pellets* congelados con un 90% p/v, descongelados a temperatura ambiente y reconstituidos a la concentración celular de cultivo inicial reveló que las células congeladas a -20 °C presentaban un borde irregular. También se observaba una gran cantidad de restos de degradación celular. Las muestras congeladas a -80 °C presentaban mejor aspecto que las congeladas a -20 °C pero con signos visibles de daño y restos celulares.

Todas las muestras de preparados con una concentración al 10% p/v, independientemente de la temperatura de congelación, presentaban un aspecto similar al de un cultivo fresco, sin muestras aparentes de degradación por aparición de restos celulares.

Congelados a -20 °C, los concentrados de TR10% y TR30% con un 90% p/v (Fig. 3.2.3A) pierden un 40% y un 30% de las células respectivamente, mayor de la atribuible a la centrifugación (12% y 20% respectivamente). Por el contrario, los concentrados normalizados a 10% p/v no presentan daño celular más allá del atribuible a la centrifugación, tras descongelar y reconstituir a volumen de cultivo (Fig. 3.2.3B). Este resultado abre las puertas a la elaboración de preparados a nivel industrial, ya que la mayoría de los procesos de separación de biomasa del medio de cultivo tienen como resultado un concentrado con un bajo contenido de sólidos (inferior al 20%, sección 2.2). Además, estos resultados ponen de manifiesto la mayor resistencia celular de los cultivos con mayor tasa de crecimiento, como ya se intuía en la sección 2.1.

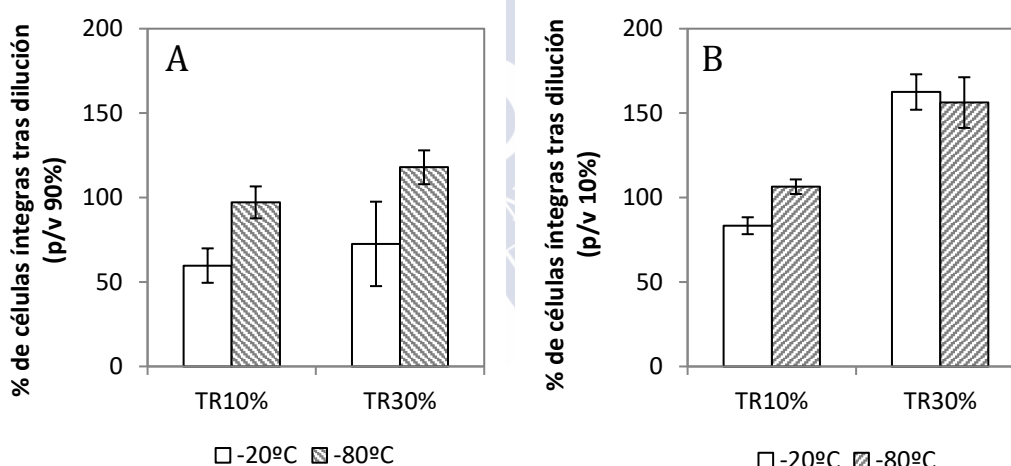


Fig. 3.2.3 Efecto de la tasa de renovación (10% y 30%), la temperatura de congelación (-20 °C y -80 °C) y el porcentaje de sólidos (90% A y 10% B) sobre la resistencia celular de concentrados de *T. lutea* congelados y reconstituidos a volumen de cultivo.

Cuando la biomasa se congela a -80 °C, no se observa degradación celular tras la dilución a volumen de cultivo para ambas tasas de renovación y concentraciones p/v (Fig. 3.2.3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cañavate & Lubián (1995b) donde se pone de manifiesto que, aunque la biomasa de *T. lutea* pierde la viabilidad tras la congelación, esta pérdida es menor si se congela a -80°C.

Sin embargo, cuando se considera la durabilidad de las células pasadas 24 h de la reconstitución se observa que congelando a -20 °C todas las células que resistieron a la congelación resisten la reconstitución cuando el producto tiene una concentración del 90% p/v (Fig. 3.2.3A) mientras que con 10% p/v se pierde casi el 50% de las células con TR10% y más del 80% con TR30% (Fig. 3.2.3B).

El patrón observado para el mantenimiento de la integridad celular 24 horas después de la dilución de los concentrados tras la congelación -20°C se repite para -80°C , aunque las pérdidas tras 24 h en los concentrados con 10 % p/v son ligeramente menores, con -42,05% para TR 10% y -69,44% para TR30%. Esto demuestra la importancia de la evaluación del comportamiento de la pasta tras 24 h, que revela daños celulares que no se aprecian justo en el momento de la dilución a densidad de trabajo y que pueden empeorar la calidad del agua en los criaderos si las células microalgales no se consumen en las primeras horas tras su administración (Fig 3.2.5).

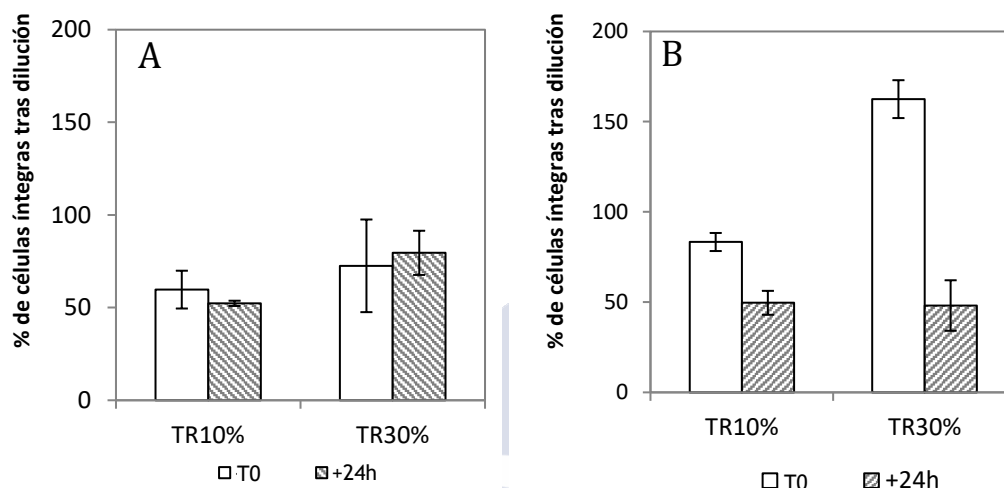


Fig. 3.2.4 Efecto de la tasa de renovación (10% y 30%), y el porcentaje de sólidos 90% p/v (A) y 10% p/v (B) sobre la resistencia celular de concentrados de *T. lutea* congelados a -20°C y reconstituidos a volumen de cultivo en el momento de la reconstitución y 24h después.

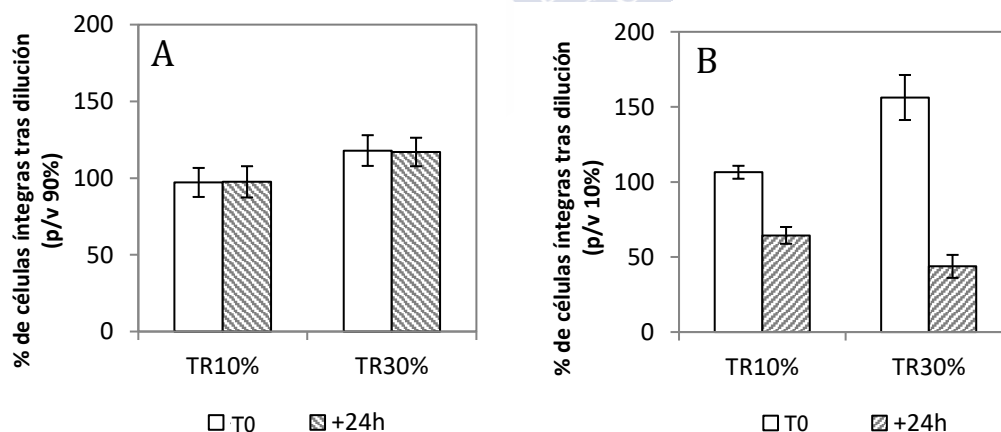


Fig. 3.2.5 Efecto de la tasa de renovación (10% y 30%), y el porcentaje de sólidos 90% p/v (A) y 10% p/v (B) sobre la resistencia celular de concentrados de *T. lutea* congelados a -80°C y reconstituidos a volumen de cultivo en el momento de la reconstitución y 24h después.

Debido a estos resultados, se concluye que la tasa de renovación del 30%, la temperatura de congelación a -80°C y la concentración 90% p/v minimizan el impacto del procesado y son los parámetros más adecuados para elaborar los productos basados en biomasa de

T. lutea. Sin embargo, como la concentración de las pastas producidas por las centrifugas industriales está en torno a un 10% p/v, se decide realizar los productos para probar en el rotífero con esta concentración.

Efecto de la tasa de renovación, la temperatura de congelación y el porcentaje de sólidos en la calidad de productos liofilizados de *T. lutea*

La biomasa producida con tasas de renovación del 10% y 30% y centrifugada a 2.000g, con un 90% o un 10% p/v y congelada a -20 °C y -80 °C se liofilizó para obtener un producto de alta durabilidad que en teoría conserva las propiedades nutricionales (Fig. 3.2.6).

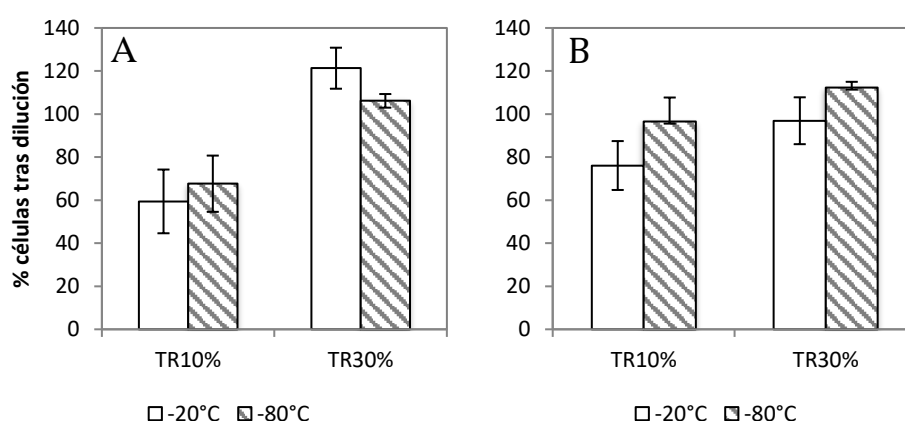


Fig. 3.2.6 Efecto de la tasa de crecimiento (10% y 30%), la temperatura de congelación (-20 °C y -80 °C y el porcentaje de sólidos 90% p/v (A) y 10% p/v (B) sobre la resistencia celular de concentrados de *T. lutea* congelados, liofilizados y diluidos a concentración de cultivo.

Los resultados de resistencia a la dilución tras la liofilización (Fig. 3.2.6) replican a los obtenidos tras la congelación (Fig. 3.2.3) salvo en el caso del concentrado al 90% a partir de cultivo de TR10% y congelado a -80 °C (Fig. 3.2.4A) que sufre una pérdida de un 30% más de las células. Estos resultados sugieren que la liofilización no produce daño celular y que se arrastra el daño producido por los demás procesos (concentración y congelación).

Pasadas 24 h de la reconstitución todos los concentrados presentaron densidades iguales o superiores (Fig. 3.2.7 y 3.2.8) salvo en el caso identificado en el punto anterior (3.2.7A) donde hay una ligera reducción sobre el valor inicial pero el valor absoluto se encuentra en torno a un 95% de resistencia. Estos resultados constatan que la liofilización no introduce más daño al procesado.

Cabe destacar que los valores superiores de densidad obtenidos tras 24h pueden deberse a que el producto se ha homogeneizado mejor tras rehidratarse, lo que permitió realizar recuentos más precisos.

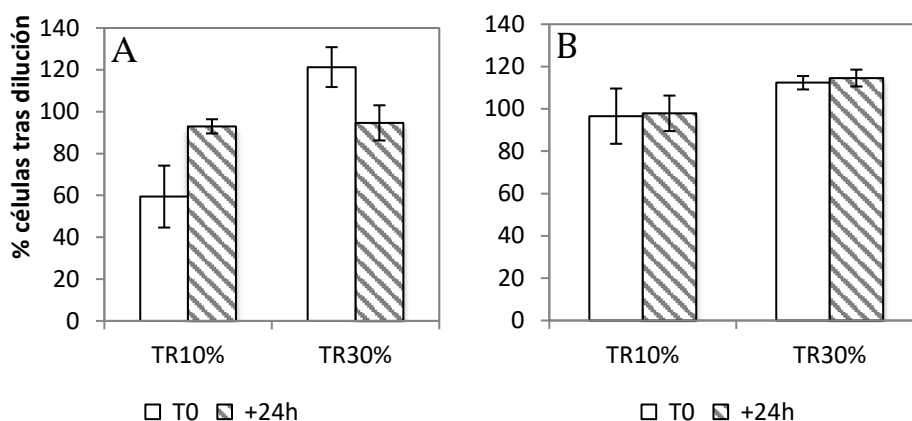


Fig. 3.2.7 Efecto de la tasa de crecimiento (10% y 30%), y el porcentaje de sólidos (90% A y 10% B) sobre la resistencia celular de concentrados de *T. lutea* congelados a -20 °C, liofilizados y reconstituidos a volumen de cultivo en el momento de la reconstitución y 24h después.

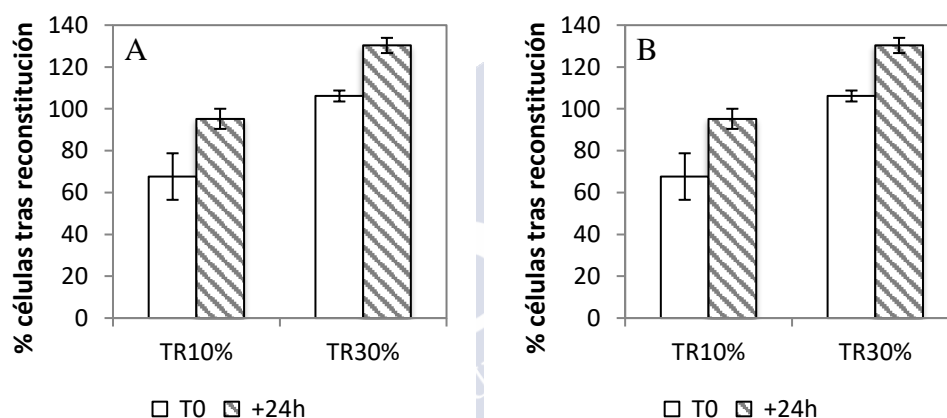


Fig. 3.2.8 Efecto de la tasa de crecimiento (10% y 30%), y el porcentaje de sólidos 90% p/v (A) y 10% p/v (B) sobre la resistencia celular de concentrados de *T. lutea* congelados a -80 °C, liofilizados y reconstituidos a volumen de cultivo en el momento de la reconstitución y 24h después.

Confirmando los resultados anteriores, los productos elaborados con biomasa TR30%, congelados con un 10% de concentración p/v a -80 °C soportan mejor la liofilización y la reconstitución a volumen de cultivo. No hay degradación celular como resultado de la liofilización y la desintegración es atribuible al paso anterior en el procesado.

Efecto del procesado de *T. lutea* sobre su calidad como alimento para el rotífero *B. plicatilis*

Se seleccionaron para probar en el rotífero los productos que mejores resultados de integridad celular y resistencia al procesado presentaron en los experimentos anteriores. De esta forma, se alimentó a *B. plicatilis* con el mismo número de células de *T. lutea* procedentes de un cultivo semicontinuo con TR30%, en fresco concentradas al 10% p/v preservadas a 4°C, congeladas a -80 °C y liofilizadas (Fig. 3.2.8).

El procesado disminuye el valor como alimento de *T. lutea* para el rotífero *B. plicatilis*. Aunque en los tres primeros días no hay diferencias entre los tratamientos, a partir del

cuarto día de cultivo se observa que los rotíferos alimentados con biomasa fresca o concentrada y preservada a 4 °C empiezan a producir mejores resultados tanto en crecimiento (3.2.9) como en fertilidad (3.2.10). A partir del día 5 se ponen de manifiesto las diferencias entre la biomasa fresca y el concentrado refrigerado a 4°C. Tras 7 días, los cultivos alimentados con biomasa fresca pasaron de 25.000 rotíferos a casi 200.000 mientras que los alimentados con el concentrado solo llegan a 125-000. Los alimentados con biomasa congelada y liofilizada apenas muestran crecimiento (Fig. 3.2.9).

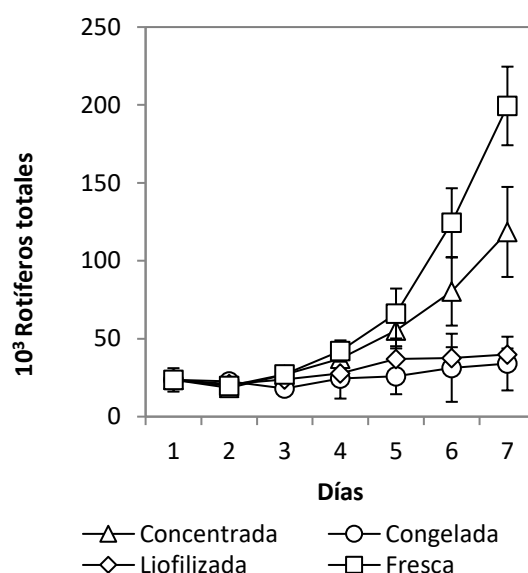


Fig. 3.2.9 Efecto de la preservación de concentrados de *T. lutea* preservados a 4 °C, congelada a -80 °C o liofilizados sobre el crecimiento del rotífero *B. plicatilis*

Ferreira (2006) obtuvo resultados ligeramente inferiores para cultivos de rotífero alimentados con *T. lutea* en condiciones similares (incremento poblacional de 25 000 a 170 000 rotíferos en 8 días) que pueden deberse a que en su experimento fue necesario filtrar y resuspender los rotíferos para mantener el volumen, lo que pudiera producir estrés o pérdida de rotíferos durante el filtrado.

Aunque hay autores que achacan peores resultados de productos congelados y liofilizados a las pérdidas nutricionales sufridas durante el procesamiento (Babarro *et al.*, 2001; Seychelles *et al.*, 2009), en el presente capítulo se demuestra que, controlando los parámetros de cultivo y procesado, el daño celular con la concomitante pérdida nutricional se minimiza, por lo que los peores resultados obtenidos se deben a otros factores.

Cañavate & Fernandez (2001) demostraron que no hay diferencias en alimentar rotífero con *T. lutea* o *Nannochloropsis gaditana* liofilizadas (tras congelación a -80 °C) o en fresco y otros autores han cultivado con éxito rotíferos con productos congelados (Lubzens *et al.*, 1995), liofilizados (Hidu & Ukeles, 1962; Navarro, 1999; Yúfera & Navarro, 1995) o concentrados (Maruyama *et al.*, 1997)

Estos resultados indican que la razón de la peor aceptación de productos procesados pueda ser la menor permanencia en la columna de agua. Como se observa en la sección 3.1, los

concentrados una vez reconstituidos presentan un porcentaje de depósito del 23,94%. Esas células, aunque íntegras y nutricionalmente adecuadas, al menos durante las primeras 24h, no estarán disponibles para su consumo por parte del rotífero. Esta tasa de depósito será más acusada para células congeladas o liofilizadas (Cañavate & Fernández-Díaz, 2001). Este parámetro físico podría mejorarse utilizando sistemas de dosificación continua de alimento, frente a alimento suministrado en dos raciones por día en el presente experimento.

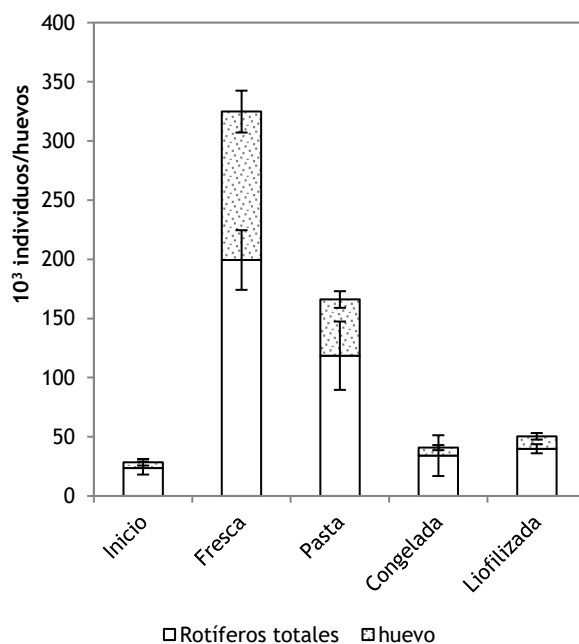


Fig. 3.2.10 Efecto de la preservación de concentrados de *T. lutea* preservados a 4 °C -80 v o liofilizados sobre la población total y número de huevos de *B. plicatilis* al final del experimento (7 días, n=3).

En el presente trabajo se demuestra que *T. lutea* se puede producir de forma estable en cultivos semicontinuos, tanto en laboratorio como en sistemas exteriores, utilizando fertilizantes agrícolas, siempre que se utilice la formulación adecuada y se tenga en cuenta el rango de temperaturas de crecimiento de esta microalga. Se demuestra también que los parámetros de operación de las centrífugas, como la fuerza centrífuga relativa y el tiempo de centrifugación, así como el estado nutricional de las células, el contenido de sólidos y la temperatura de congelación, afectan a la calidad de los productos elaborados a partir de cultivos de *T. lutea*. Sin embargo, se necesita seguir trabajando en la minimización del daño celular durante el procesado para que productos de alta durabilidad, como concentrados, congelados y liofilizados, produzcan los mismos resultados que la microalga fresca en la alimentación de organismos filtradores en la acuicultura.



CONCLUSIONES

Tisochrysis lutea presenta una temperatura óptima de crecimiento mayor que *Isochrysis galbana*, aunque sus rangos son solapantes: entre 15 °C y 27 °C con un óptimo a 15 °C para *I. galbana* mientras que *T. lutea* presenta su óptimo a 27 °C con un rango de crecimiento entre 22 °C y 27 °C.

Los experimentos con sistemas exteriores a escala piloto demuestran que ambas especies pueden cultivarse de forma estacional en exteriores para evitar bajas productividades y colapsos de los cultivos, utilizando *I. galbana* en otoño/invierno y *T. lutea* en primavera/verano. La productividad de *T. lutea* en verano es casi el doble que la de *I. galbana* con $7,92 \cdot 10^9$ células·L⁻¹·día⁻¹ frente a $4,43 \cdot 10^9$ células·L⁻¹·día⁻¹.

La luz y la temperatura controlan la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos: La temperatura modifica las densidades de equilibrio, las cuales a su vez hacen variar la luz efectiva por célula favoreciendo la incorporación de carbono. A temperaturas subóptimas se incrementa la síntesis de proteína.

El porcentaje de DHA se incrementa con el incremento de la temperatura en ambas tanto en *T. lutea* como en *I. galbana*, pero para el resto de los ácidos grasos parece que la elongación y poliinsaturación están gobernadas por otros factores además de la temperatura.

Las concentraciones de oligoelementos y vitaminas presentes en el medio Algal son suficientes para alcanzar la mayor densidad de equilibrio en las condiciones ensayadas. Magnesio, Calcio, Boro, Selenio, y Cromo no son elementos necesarios en el medio de cultivo de *T. lutea*.

La adición de vitamina B₁ en el medio de cultivo es imprescindible ya que no parece ser suministrada por la microbiota acompañante. Por el contrario, no es necesaria la adición de vitamina B₁₂ en un cultivo *batch* porque presumiblemente las bacterias del cultivo exudan suficiente cantidad como para que no sea limitante. La vitamina B₇ no es necesaria para el crecimiento de *T. lutea*.

El fertilizante agrícola disponible en la E. E Las Palmerillas es adecuado para el cultivo de *T. lutea* sin necesidad de incrementar la concentración de oligoelementos o suplementar con cobalto. Es necesario suplementar el fertilizante con las vitaminas a la misma concentración del medio Algal.

No hay diferencias entre el nitrato de sodio de grado analítico y el industrial. El nitrato de calcio y el nitrato de sodio se pueden utilizar indistintamente pero el nitrato de potasio produce peores resultados de crecimiento.

El cultivo de *T. lutea* es posible en exteriores en fotobiorreactor *airlift* tubular horizontal, bolsa cilíndrica, bolsa plana o columna de burbujeo, siendo la productividad de los sistemas proporcional a la luz disponible, ya sea por el paso de luz del sistema o la época

del año, siempre que la temperatura esté controlada. El sistema más productivo fue la bolsa plana, con $13,28 \cdot 10^9$ células·L⁻¹·día⁻¹ y 0.285 g·L⁻¹·día⁻¹

El estado nutricional de las células de *T. lutea* tiene efecto sobre la resistencia de éstas al procesado. Las células cultivadas con una TR30% son más resistentes que las cultivadas con TR10%.

El incremento de la fuerza de centrifugación aplicada en el proceso de cosechado incrementa la lisis celular y la carga bacteriana en *T. lutea*, disminuyendo la calidad de los concentrados.

El empleo de atmósferas protectoras no mejora la durabilidad de concentrados de *T. lutea*, aunque es necesario realizar pruebas con sistemas de aplicación diferentes al difusor cerámico con concentrados más controlados.

Los ácidos grasos se deterioran sensiblemente y de forma proporcional durante la preservación, siendo más acusada la degradación en el concentrado elaborado con biomasa de mayor tasa de renovación.

Un mayor porcentaje de sólidos en el concentrado protege frente a la congelación, que será menos dañina a -80°C que a -20°C. La liofilización no produce daño celular más allá del acumulado en los procesos anteriores de procesado.

En cultivos discontinuos de rotífero con dos raciones diarias, sólo la biomasa fresca y la concentrada de *T. lutea* producen crecimiento aceptable.





BIBLIOGRAFÍA

Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Sánchez Pérez, J. A., Molina Grima, E. & Chisti, Y. 2001. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56 (8): 2721-2732.

Acién Fernández, F. G., Fernández, J. M., Magán, J. J. & Molina Grima, E. 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30 (6): 1344-1353.

Acién Fernández, F. G., González-López, C. V., Fernández Sevilla, J. M. & Molina Grima, E. 2012. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96 (3): 577-586.

Ackman, R. G., Tocher, C. S. & McLachlan, J. 1968. Marine phytoplankter fatty acids. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 25 (8): 1603-1620.

Adlerstein, D., Bigogno, C., Khozin, I. & Cohen, Z. 1997. The effect of growth, temperature and culture density on the molecular species composition of the galactolipids in the microalga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 33 (6): 975-979.

Aiba, S. 1982. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Advances in biochemical engineering*, 2385-156.

Alam, M. A., Wan, C., Guo, S., Zhao, X., Huang, Z., Yang, Y., Chang, J. & Bai, F. 2014. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118 (1): 29-33.

Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U. & Fernández-Reiriz, M. J. 1997. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 154 (3-4): 305-321.

Alkint, C., Wadsö, L. & Sjöholm, I. 2004. Effects of modified atmosphere on shelf-life of carrot juice. *Food Control*, 15 (2): 131-137.

An, M., Mou, S., Zhang, X., Ye, N., Zheng, Z., Cao, S., Xu, D., Fan, X., Wang, Y. & Miao, J. 2013. Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Bioresource technology*, 134 (0): 151-157.

Andersen, R. A. (2005). Algal culturing techniques: Academic press.

Anthony, R. J., Ellis, J. T., Sathish, A., Rahman, A., Miller, C. D. & Sims, R. C. 2013. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. *Bioresource technology*, 14965-70.

Aparici, E., Carmona, M. J. & Serra, M. 2001. Variability for mixis initiation in *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 446:45-50.

Babarro, J. M. F., Fernández-Reiriz, M. J. & Labarta, U. 2001. Influence of preservation techniques and freezing storage time on biochemical composition and spectrum of fatty acids of *Isochrysis galbana* clone T-ISO. *Aquaculture Research*, 32 (7): 565-572.

Banerjee, C., Ghosh, S., Sen, G., Mishra, S., Shukla, P. & Bandopadhyay, R. 2014. Study of algal biomass harvesting through cationic cassia gum, a natural plant based biopolymer. *Bioresource technology*, 151:6-11.

Banerjee, C., Gupta, P., Mishra, S., Sen, G., Shukla, P. & Bandopadhyay, R. 2012. Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. *International journal of biological macromolecules*, 51 (4): 456-461.

Barakoni, R., Awal, S. & Christie, A. 2015. Growth performance of the marine microalgae *Pavlova salina* and *Dunaliella tertiolecta* using different commercially available fertilizers in natural seawater and inland saline ground water. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6 (1): 15-25.

Barnes, R. D., Ruppert, E. E. & Litvaitis, M. K. (1968). Invertebrate zoology: WB Saunders Philadelphia.

Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M. & Pires, J. C. M. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41 (0): 1489-1500.

Beiras, R., Pérez-Camacho, A. & Albentosa, M. 1993. Influence of food concentration on energy balance and growth performance of *Venerupis pullastra* seed reared in an open-flow system. *Aquaculture*, 116 (4): 353-365.

Ben-Amotz, A., Fishler, R. & Schneller, A. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Marine Biology*, 95 (1): 31-36.

Bendif, E., Probert, I., Schroeder, D. & de Vargas, C. 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of applied phycology*, 25 (6): 1763-1776.

Benemann, J. R. 2008. Opportunities and challenges in algae biofuels production. A position paper. *Algae World 2008*.

Berges, J. A., Franklin, D. J. & Harrison, P. J. 2001. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology*, 37 (6): 1138-1145.

- Beuckels, A., Depraetere, O., Vandamme, D., Foubert, I., Smolders, E. & Muylaert, K. 2013. Influence of organic matter on flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium phosphate precipitation. *Biomass and Bioenergy*, 54 (0): 107-114.
- Bisutti, I., Hilke, I. & Raessler, M. 2004. Determination of total organic carbon – an overview of current methods. *TrAC, Trends in analytical chemistry (Regular ed.)*, 23 (10): 716-726.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (8): 911-917.
- Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9 (5): 393-401.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70 (1-3): 313-321.
- Bosma, R., Spronsen, W. A., Tramper, J. & Wijffels, R. H. 2003. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 15:143-153.
- Boussiba, S., Sandbank, E., Shelef, G., Cohen, Z., Vonshak, A., Ben-Amotz, A., Arad, S. & Richmond, A. 1988. Outdoor cultivation of the marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors. *Aquaculture*, 72 (3-4): 247-253.
- Brand, J. J. & Diller, K. R. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. *Nova Hedwigia*, 79 (1-2): 175-189.
- Brennan, L. & Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14 (2): 557-577.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W. & Garland, C. D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review: CSIRO Marine Laboratories, Hobart.
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. L. & Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11 (3): 247-255.
- Brown, M. R. & Robert, R. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207 (3-4): 289-309.
- Bruce, J. R., Knight, M. & Parke, M. W. 1940. The rearing of oyster larvae on an algal diet. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 24 (01): 337-374.
- Burgess, J. G., Iwamoto, K., Miura, Y., Takano, H. & Matsunaga, T. 1993. An optical-fiber photobioreactor for enhanced production of the marine unicellular alga *Isochrysis aff galbana* T-ISO (Utex-Lb-2307) rich in Docosahexaenoic Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39 (4-5): 456-459.

Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M. C., González-López, C. V., Fernández-Sevilla, J. M., Contreras-Gómez, A. & Molina-Grima, E. 2013. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. *Bioresource technology*, 144 (0): 57-66.

Camacho-Rodríguez, J., González-Céspedes, A. M., Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., Acien-Fernández, F. G. & Molina-Grima, E. 2014. A quantitative study of eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture as a function of dilution rate, temperature and average irradiance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (6): 2429-2440.

Cañavate, J. P. & Fernández-Díaz, C. 2001. Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193 (3-4): 257-269.

Cañavate, J. P. & Lubián, L. M. 1995a. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology*, 124 (2): 325.

Cañavate, J. P. & Lubián, L. M. 1995b. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture*, 136 (3-4): 277-290.

Carvalho, A. P., Meireles, L. A. & Malcata, F. X. 2006. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22 (6): 1490-1506.

Carvalho, A. P., Monteiro, C. M. & Malcata, F. X. 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *Journal of Applied Phycology*, 21 (5): 543-552.

Cheirsilp, B. & Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*, 110510-516.

Chen, F., Liu, Z., Li, D., Liu, C., Zheng, P. & Chen, S. 2012a. Using ammonia for algae harvesting and as nutrient in subsequent cultures. *Bioresource technology*, 121 (0): 298-303.

Chen, L., Wang, C., Wang, W. & Wei, J. 2013. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresource technology*, 133 (0): 9-15.

Chen, S., Pan, L., Hong, M. & Lee, A. 2012b. The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Botanical Studies*, 53 (1): 125-133.

Cheng, Y., Labavitch, J. M. & VanderGheynst, J. S. 2014. Elevated CO₂ concentration impacts cell wall polysaccharide composition of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Letters in applied microbiology*/a.

- Chini Zittelli, G., Pastorelli, R. & Tredici, M. R. 2000. A modular flat panel photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *Journal of Applied Phycology*, 12 (3-5): 521-526.
- Chini-Zittelli, G., Rodolfi, L. & Tredici, M. R. 2003. Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors. *Journal of Applied Phycology*, 15107-114.
- Chisholm, S. W., Stross, R. G. & Nobbs, P. A. 1975. Light/dark-phased cell division in *Euglena gracilis* (Z) (Euglenophyceae) in PO₄-limited continuous culture. *Journal of phycology*, 11 (4): 367-373.
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S. & Veron, B. 2008. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology*, 51 (1): 1.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A. & Harrison, P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, 11 (2): 179-184.
- Coutteau, P. & Sorgeloos, P. 1993. Substitute diets for live algae in the intensive rearing of bivalve mollusk-a state of the art report. *World Aquaculture*, 24 (2): 45-52.
- Coutteau, P. & Sorgeloos, P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11467.
- Craggs, R. J., Lundquist, T. J. & Benemann, J. R. (2012). Wastewater Treatment and Algal Biofuel Production. In Anonymous Algae for Biofuels and Energy (pp. 153-163). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & Smith, A. G. 2005. Algae acquire vitamin B-12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438 (7064): 90-93.
- Croft, M. T., Warren, M. J. & Smith, A. G. 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell*, 5 (8): 1175-1183.
- Cuaresma Franco, M., Buffing, M. F., Janssen, M., Vilchez Lobato, C. & Wijffels, R. H. 2012. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24 (4): 693-699.
- Dassey, A. J. & Theegala, C. S. 2013. Reducing electrocoagulation harvesting costs for practical microalgal biodiesel production. *Environmental technology* 1-7.
- Day, J. G., Lorenz, M., Wilding, T. A., Friedl, T., Harding, K., Prohold, T., Brennan, D., Muller, J., Santos, L. M. A., Santos, M. F., Osorio, H. C., Amaral, R., Lukesova, A., Hrouzek, P., Lukes, M., Elster, J., Lukavsky, J., Probert, I., Ryan, M. J. & Benson, E. E. 2007. The use of physical and virtual infrastructures for the validation of algal cryopreservation methods in international culture collections. *Cryoletters*, 28359-376.

De Andrade, G. A., Berenguel, M., Guzmán, J. L., Pagano, D. J. & Acién, F. G. 2016. Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, 3758-69.

Dodson, V. J., Mouget, J., Dahmen, J. & Leblond, J. 2013. The long and short of it: temperature-dependent modifications of fatty acid chain length and unsaturation in the galactolipid profiles of the diatoms *Haslea ostrearia* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Hydrobiologia* 1-13.

Doucha, J., Straka, F. & Lívanský, K. 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 17 (5): 403-412.

Droop, M. R. (1962). Organic Micronutrients. In R. A. Lewin (Ed.), *Physiology and Biochemistry of Algae* (pp. 141-159). New York; London: Academic Press.

D'Souza, F. M. L., Lecossois, D., Heasman, M. P., Diemar, J. A., Jackson, C. J. & Pendrey, R. C. 2000. Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* Fabricius larvae. *Aquaculture Research*, 31 (8-9): 661-670.

Duerr, E. O., Molnar, A. & Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of marine biotechnology*, 6 (2): 65-70.

Durmaz, Y., Donato, M. D., Monteiro, M., Gouveia, L., Nunes, M. L., Pereira, T. G., Gokpinar, S. & Bandarra, N. M. 2009. Effect of temperature on alpha-tocopherol, fatty acid profile, and pigments of *Diacronema vlkianum* (Haptophyceae). *Aquaculture International*, 17 (4): 391-399.

Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpinar, Ş & Işık, O. 2007. The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*, 19 (3): 223-227.

Edwardsen, B., Eikrem, W., Green, J. C., Andersen, R. A., Moon-van der Staay, Seung Yeo & Medlin, L. K. 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia*, 39 (1): 19-35.

Eldridge, R. J., Hill, D. & Gladman, B. R. 2012. A comparative study of the coagulation behaviour of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 24 (6): 1667-1679.

Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S. & Castell, J. D. 1986. Evaluation of Phytoplankton as Diets for Juvenile *Ostrea-Edulis* L. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 96 (1): 1-13.

Ewart, J. W. & Pruder, G. D. 1981. Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis aff. galbana*, Clone T-ISO at four temperatures and three light intensities. *Journal of the World Mariculture Society*, 12 (1): 333-339.

Fabregas, J., Abalde, J., Cabezas, B. & Herrero, C. 1989. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*

(Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. *Aquacultural engineering*, 8 (4): 223-239.

Fábregas, J., Abalde, J. & Herrero, C. 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83 (3): 289-304.

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42 (3-4): 207-215.

Fábregas, J., Arán, J., Morales, E. D., Lamela Pérez, T. & Otero, A. 1997. Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry*, 46 (7): 1189-1191.

Fábregas, J., Cid, A., Morales, E., Cordero-Esquivel, B. & Otero, A. 1996. Discrepancies between cell volume and organic content in semi-continuous cultures of a marine microalga. *Letters in applied microbiology*, 22 (3): 206-208.

Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. & Otero, A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53 (5): 530-535.

Fábregas, J., Ferrón, L., Abalde, J., Cabezas, B. & Otero, A. 1995. Changes in the gross chemical composition of mass cultures of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* with different aeration rates. *Bioresource Technology*, 53 (2): 185-188.

Fábregas, J., García, D., Morales, E., Domínguez, A. & Otero, A. 1998. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (5): 477-481.

Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. 1987. Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentration. *British Phycological Journal*, 22 (3): 269-276.

Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Ferreira, M. & Otero, A. 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light:dark cycle. *Biotechnology Letters*, 24 (20): 1699-1703.

Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A. & Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 20 (1): 31-35.

Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero-Esquivel, B. & Patino, M. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*, 143 (2): 197-204.

Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B. O., Tobar, J. L. & Otero, A. 1995. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (3-4): 287-292.

Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E. D., Cordero-Esquivel, B. & Otero, A. 1996. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62 (1): 266-268.

Fábregas, J., Patiño, M., Vecino, E., Chazaro, F. & Otero, A. 1995. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 (4): 617-621.

FAO 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020.

Fernández-Reiriz, M. J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J. & Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83 (1-2): 17-37.

Fernández-Sevilla, J., Acien Fernández, F. & Molina Grima, E. 2010. Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (1): 27-40.

Ferreira, M. 2006. Optimización do valor nutritivo de microalgas mariñas para o enriquecemento e cultivo do rotífero *Brachionus plicatilis*. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.

Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J. & Otero, A. 2009. Enriching Rotifers with "Premium" Microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Marine Biotechnology*, 11 (5): 585-595.

Ferreira, M., Fábregas, J. & Otero, A. 2008. Enriching rotifers with "premium" microalgae. *Isochrysis aff. galbana* clone T-ISO. *Aquaculture*, 279:126-130.

Ferreira, M., Seixas, P., Coutinho, P., Fábregas, J. & Otero, A. 2011. Effect of the nutritional status of semi-continuous microalgal cultures on the productivity and biochemical composition of *Brachionus plicatilis*. *Marine biotechnology*, 13 (6): 1074-1085.

Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. & Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166 (1-2): 105-116.

Freire, I., Cortina-Burgueño, A., Grille, P., Arizcun Arizcun, M., Abellán, E., Segura, M., Witt Sousa, F. & Otero, A. 2016. *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture. *Aquaculture*, 459:124-130.

- Gallagher, M. L., Daniels, H. V. & Harcke, J. E. 2001. Influence of the enrichment time with algae paste preservation on the fatty acid content of rotifer. *World Aquaculture*, 32 (2): 56-61.
- Garg, S., Li, Y., Wang, L. & Schenk, P. M. 2012. Flotation of marine microalgae: Effect of algal hydrophobicity. *Bioresource technology*, 121 (0): 471-474.
- Garg, S., Wang, L. & Schenk, P. M. 2014. Effective harvesting of low surface-hydrophobicity microalgae by froth flotation. *Bioresource technology*, 159437-441.
- Gatesoupe, F. J. & Luquet, P. 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* : application to larval rearing of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 22(1-2), 149-163.
- Gerardo, M. L., Oatley-Radcliffe, D. L. & Lovitt, R. W. 2013. Minimizing the energy requirement of dewatering *Scenedesmus* sp. by microfiltration: performance, costs, and feasibility. *Environmental science & technology*, 48 (1): 845-853.
- Gerardo, M. L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T. & Skill, S. C. 2015. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, 11248-262.
- Gilbert, F., Galgani, F. & Cadiou, Y. 1992. Rapid Assessment of Metabolic-Activity in Marine Microalgae - Application in Ecotoxicological Tests and Evaluation of Water-Quality. *Marine Biology*, 112 (2): 199-205.
- Ginzburg, M. 1987. *Dunaliella* - a Green-Alga Adapted to Salt. *Advances in Botanical Research*, 1493-183.
- Gnaiger, E. & Bitterlich, G. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia*, 62 (3): 289-298.
- González-Fernández, C. & Ballesteros, M. 2013. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *Journal of applied phycology*, 25 (4): 991-999.
- Grobbelaar, J. U. 2009. Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate. *Journal of Applied Phycology*, 21 (5): 489-492.
- Guillard, R. R. L. & Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms : I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8 (2): 229-239.
- Haines, K. C. & Guillard, R. R. 1974. Growth of Vitamin-B12-Requiring Marine Diatoms in Mixed Laboratory Cultures with Vitamin-B12-Producing Marine Bacteria. *Journal of Phycology*, 10 (3): 245-252.

Hamawand, I., Yusaf, T. & Hamawand, S. 2014. Growing algae using water from coal seam gas industry and harvesting using an innovative technique: A review and a potential. *Fuel (Guildford)*, 117422-430.

Hancke, K., Hancke, T. B., Olsen, L. M., Johnsen, G. & Glud, R. N. 2008. Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence and ¹⁴C assimilation. *Journal of Phycology*, 44 (2): 501-514.

Harun, R., Singh, M., Forde, G. M. & Danquah, M. K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (3): 1037-1047.

Harwood, J. L. 1988. Fatty Acid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39 (1): 101-138.

Heasman, M. P., Diemar, J. A., O'Connor, W., Sushames, T. & Foulkes, L. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. *Aquaculture Research*, 31 (8-9): 637-659.

Helm, M. M. & Laing, I. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of 'Tahiti *Isochrysis*' to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62 (3): 281-288.

Helm, M. M., Holland, D. L. & Stephens, R. 1973. Effect of Supplementary Algal Feeding of a Hatchery Breeding Stock of *Ostrea-Edulis* L on Larval Vigor. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53 (3): 673-684.

Herrero, C., Cid, A., Fabregas, J. & Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural engineering*, 10 (2): 99-110.

Hidu, H. & Ukeles, R. 1962. Dried unicellular algae as food for larvae of the hard shell clam, *Mercenaria mercenaria*, 5385-101.

Hirayama, K. & Nakamura, K. 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture. 5. Dry *Chlorella* powder as a food for rotifers. *Aquaculture*, 8 (4): 301-307.

Hochachka, P. W. & Somero, G. N. 1984. Biochemical adaptation: basic mechanisms and strategies. *Biochemical Adaptation* 3-14.

Hori, T. & Green, J. C. 1985. The Ultrastructure of Mitosis in *Isochrysis galbana* Parke (Prymnesiophyceae). *Protoplasma*, 125 (1-2): 140-151.

Hu, H., Li, H. & Xu, X. 2008. Alternative cold response modes in *Chlorella* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) from Antarctica. *Phycologia*, 47 (1): 28-34.

- Hu, Y., Guo, C., Xu, L., Wang, F., Wang, S., Hu, Z. & Liu, C. 2014. A magnetic separator for efficient microalgae harvesting. *Bioresource technology*, 158 (0): 388-391.
- Hu, Y., Wang, F., Wang, S., Liu, C. & Guo, C. 2013. Efficient harvesting of marine microalgae *Nannochloropsis maritima* using magnetic nanoparticles. *Bioresource technology*, 138 (0): 387-390.
- ICSH 1988. International committee for standardisation in haematology: selected method for visual platelet counting. *Labmedica*, 525-36.
- Ippoliti, D., González, A., Martín, I., Sevilla, J. M. F., Pistocchi, R. & Acién, F. G. 2016. Outdoor production of *Tisochrysis lutea* in pilot-scale tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 28 (6): 3159-3166.
- Jacobsen, A., Grahl-Nielsen, O. & Magnesen, T. 2010. Does a large-scale continuous algal production system provide a stable supply of fatty acids to bivalve hatcheries?. *Journal of Applied Phycology*, 22 (6): 769-777.
- James, C. M., Al-Hinty, S. & Salman, A. E. 1989. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77 (4): 337-351.
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R. & Wijffels, R. H. 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and bioengineering*, 81 (2): 193-210.
- Jiang, H. & Gao, K. 2004. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 40 (4): 651-654.
- Kain, J. M. & Fogg, G. E. 1958. Studies on the Growth of Marine Phytoplankton .2. *Isochrysis galbana* Parke. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37 (3): 781-788.
- Kaplan, D., Cohen, Z. & Abeliovich, A. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9 (1): 37-48.
- Kenneth Gold, Oswald A. Roels & Harvey Bank 1966. Temperature Dependent Destruction of Thiamine in Seawater. *Limnology and Oceanography*, 11 (3): 410-413.
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., Park, M. S. & Yang, J. 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31 (6): 862-876.
- Knauer, J. & Southgate, P. C. 1999. A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 7 (3-4): 241-280.

Knauer, J. & Southgate, P. C. 1996. Nutritional value of a spray-dried freshwater alga, *Spongiococcus excentricum*, for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Aquaculture*, 146 (1–2): 135-146.

Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R. & Frampton, D. M. F. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35300-313.

Kräbs, G. & Büchel, C. 2011. Temperature and salinity tolerances of geographically separated *Phaeodactylum tricornutum* Böhlin strains: maximum quantum yield of primary photochemistry, pigmentation, proline content and growth. *Botanica Marina*, 54 (3): 231-241.

Kró, M., Maxwell, D. P. & Huner, N. P. 1997. Exposure of *Dunaliella salina* to low temperature mimics the high light-induced accumulation of carotenoids and the carotenoid binding protein (Cbr). *Plant and cell physiology*, 38 (2): 213-216.

Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P. & Bernard, O. Diel variations of carbohydrates and neutral lipids in nitrogen-sufficient and nitrogen-starved cyclostat cultures of *Isochrysis* sp.1. *Journal of phycology*, 48 (4): 966-975.

Lee, A. K., Lewis, D. M. & Ashman, P. J. 2009a. Harvesting of a Marine Microalgae for the Production of Biodiesel by Microbial Flocculation. *Phycologia*, 48 (4): 205.

Lee, A. K., Lewis, D. M. & Ashman, P. J. 2009b. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, 21 (5): 559-567.

Levasseur, M. E., Morissette, J., Popovic, R. & Harrison, P. J. 1990. Effect of long-term exposure to low temperature on the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 26 (3): 479-484.

Levin, G. V., Clendenning, J. R., Gibor, A. & Bogar, F. D. 1962. Harvesting of Algae by Froth Flotation. *Applied Microbiology*, 10169-175.

Li, X., Li, W., Zhai, J. & Wei, H. 2018. Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, 263555-561.

Lie, O., Haaland, H., Hemre, G. I., Maage, A., Lied, E., Rosenlund, G., Sandnes, K. & Olsen, Y. 1997. Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae. *Aquaculture International*, 5 (5): 427-438.

Lim, H. C. & Shin, H. S. (2013). *Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors*. Cambridge: Cambridge University Press.

Lin, Y. H., Chang, F. L., Tsao, C. Y. & Leu, J. Y. 2007. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical engineering journal*, 37166-176.

- Liu, C. P. & Lin, L. P. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42 (3): 207-214.
- Liu, J. & Bangert, K. 2014. Effect of nitrogen source in low-cost media on biomass and lipid productivity of *Nannochloropsis salina* for large-scale biodiesel production. *Environmental Progress & Sustainable Energy*/a.
- Liu, Z., Zhang, F. & Chen, F. 2013. High throughput screening of CO₂-tolerating microalgae using GasPak bags. *Aquatic Biosystems*, 9 (1): 23.
- López Ruiz, J. L., García, R. G., Soledad, M. & Almeda, F. 1995. Marine Microalgae Culture: *Chaetoceros gracilis* with Zeolitic Product Zestec-56 and a Commercial Fertilizer as a Nutrient. *Aquacultural Engineering*, 14 (4): 367-372.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K. P. & Aidar, E. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41 (2): 158-168.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147 (1): 245-255.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. & Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133 (3-4): 295-309.
- Lukeš, M., Procházková, L., Shmidt, V., Nedbalová, L. & Kaftan, D. 2014. Temperature dependence of photosynthesis and thylakoid lipid composition in the red snow alga *Chlamydomonas* cf. *nivalis* (Chlorophyceae). *FEMS microbiology ecology*, 89 (2): 303-315.
- Mansour, M. P., Frampton, D. M. F., Nichols, P. D., Volkman, J. K. & Blackburn, S. I. 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C-24-C-28 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phycology*, 17 (4): 287-300.
- Marlowe, I. T., Green, J. C., Neal, A. C., Brassell, S. C., Eglinton, G. & Course, P. A. 1984. Long chain (n-C37–C39) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. *British Phycological Journal*, 19 (3): 203-216.
- Martinez-Cordova, L. R., Campana-Torres, A., Martinez-Porchas, M., Lopez-Elias, J. A. & Garcia-Sifuentes, C. O. 2012. Effect of alternative mediums on production and proximate composition of the microalgae *Chaetoceros muelleri* as food in culture of the copepod *Acartia* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40 (1): 169-176.
- Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, Y. & Hirayama, K. 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, 358 (1): 133-138.

- Masojíddek, J., Torzillo, G., Koblízek, M., Kopecky, J., Bernardini, P., Sacchi, A. & Komenda, J. 1999. Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta*, 209:126-135.
- Mccausland, M. A., Brown, M. R., Barrett, S. M., Diemar, J. A. & Heasman, M. P. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 174:323-342.
- Medzon, E. L. & Brady, M. L. 1969. Direct measurement of acetylcholinesterase in living protist cells. *Journal of Bacteriology*, 97 (1): 402-415.
- Meireles, L. A., Guedes, A. C. & Malcata, F. X. 2003. Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (8): 2237-2241.
- Mellor, J. D. (1978). Fundamentals of freeze-drying.: Academic Press Inc.(London) Ltd.
- Mendoza, J. L., Granados, M. R., de Godos, I., Acién, F. G., Molina Grima, E., Banks, C. & Heaven, S. 2013. Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. *Biomass and Bioenergy*, 54 (0): 267-275.
- Michels, M. H. A., Goot, v. d., A.J., Vermuë, M. H. & Wijffels, R. H. 2016. Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump. *Journal of applied phycology*, 28 (1): 53-62.
- Milke, L. M., Bricelj, V. M. & Parrish, C. C. 2006. Comparison of early life history stages of the bay scallop, *Argopecten irradians*: Effects of microalgal diets on growth and biochemical composition. *Aquaculture*, 260:272-289.
- Millamena, O. & Aujero, E. J. 1978. Preserved algae as food for *Penaeus monodon* larvae. *SEAFDEC Aquaculture Department Quarterly Research Report*, 2 (4): 15-16.
- Milledge, J. J. & Heaven, S. 2013. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12 (2): 165-178.
- Molina Grima, E., García-Camacho, F., Perez, J. A. S., Cardona, J. U., Acién Fernández, F. G. & Sevilla, J. M. F. 1994. Outdoor chemostat culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX-640 in a tubular photobioreactor for the production of eicosapentaenoic acid. *Biotechnology and applied biochemistry*, 20:279-290.
- Molina Grima, E., Perez, J. A. S., García-Camacho, F., Sevilla, J. M. F. & Acién Fernández, F. G. 1994. Effect of Growth-Rate on the Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Content of *Isochrysis galbana* in Chemostat Culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41 (1): 23-27.
- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., Camacho, F. G., Acién Fernández, F. G., Alonso, D. L. & Del Castillo, C. S. 1994a. Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. *Aquaculture*, 123 (3-4): 377-385.

- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García-Camacho, F., Sánchez, J. L. G., Acien Fernández, F. G. & López Alonso, D. 1994b. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 37 (2): 159-166.
- Montaini, E., Chini Zittelli, G., Tredici, M. R., Molina Grima, E., Fernández Sevilla, J. M. & Sánchez Pérez, J. A. 1995. Long-term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture*, 134 (1): 81-90.
- Montero, D., Socorro, J., Tort, L., Caballero, M. J., Robaina, L. E., Vergara, J. M. & Izquierdo, M. S. 2004. Glomerulonephritis and immunosuppression associated with dietary essential fatty acid deficiency in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., juveniles. *Journal of Fish Diseases*, 27 (5): 297-306.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J. & Izquierdo, M. S. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*, 225 (1): 353-370.
- Morgan-Kiss, R. M., Ivanov, A. G. & Huner, N. P. 2002. The Antarctic psychrophile, *Chlamydomonas subcaudata*, is deficient in state I–state II transitions. *Planta*, 214 (3): 435-445.
- Morist, A., Montesinos, J. L., Cusido, J. A. & Godia, F. 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37 (5): 535-547.
- Mortensen, S. H., Børsheim, K. Y., Rainuzzo, J. & Knutsen, G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 122 (2): 173-185.
- Mujumdar, A. S. 2007. An overview of innovation in industrial drying: current status and R&D needs. *Transport in Porous Media*, 66 (1): 3-18.
- Müller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12 (3-5): 527-534.
- Navarro, N. 1999. Feeding behaviour of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 237: 75-87.
- Navarro, N. & Sarasquete, C. 1998. Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae - I. Growth, histology and water quality. *Aquaculture*, 167 (3-4): 179-193.
- Nell, J. A. & O'Connor, W. A. 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99 (3-4): 277-284.

Nelson, J. R., Guarda, S., Cowell, L. E. & Heffernan, P. B. 1992. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30 degrees C. *Aquaculture*, 106 (3-4): 357-377.

Nevejan, N., Davis, J., Little, K. & Killion, A. 2007. Use of a formulated diet for mussel spat *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) in a commercial hatchery. *Journal of Shellfish Research*, 26 (2): 357-363.

Ng, W. H. A. & Liu, H. 2015. Diel variation of the cellular carbon to nitrogen ratio of *Chlorella autotrophica* (Chlorophyta) growing in phosphorus- and nitrogen-limited continuous cultures. *Journal of phycology*, 51 (1): 82-92.

Nunes, M., Pereira, A., Ferreira, J. F. & Yasumaru, F. 2009. Evaluation of the Microalgae Paste Viability Produced in a Mollusk Hatchery in Southern Brazil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40 (1): 87-94.

Olguín, E. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology advances*, 22 (1): 81-91.

Oncel, S. & Sukan, F. V. 2008. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Artrospira platensis* (*Spirulina platensis*). *Bioresource technology*, 99 (11): 4755-4760.

Orset, S. & Young, A. J. 1999. Low-temperature-induced synthesis of β -carotene in the microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35 (3): 520-527.

Otero, A. 1994. Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.

Otero, A., Arredondo-Vega, B. O., Patiño, M., Lamela Pérez, T. & Fábregas, J. 1995. Production of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids in cyclostat cultures of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Marine Biotechnology*, 382-85.

Otero, A., Domínguez, A., Lamela Pérez, T., García, D. & Fábregas, J. 1998. Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: Effect of saturating nutrient concentrations. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 227 (1): 23-33.

Otero, A. & Fábregas, J. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159 (1-2): 111-123.

Otero, A., Gamallo, Y. & Fábregas, J. 1992. Semi-continuous culture of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different nutrient concentrations and dilution rates. *Profiles on Biotechnology* 261-270.

Otero, A., García, D. & Fábregas, J. 1997. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9465-469.

- Otero, A., García, D., Morales, E. D., Arán, J. & Fábregas, J. 1997. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotechnology and applied biochemistry*, 26 (3): 171-177.
- Pacheco-Vega, J. M. & Sanchez-Saavedra, M. D. 2009. The Biochemical Composition of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann Grown) with an Agricultural Fertilizer. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40 (4): 556-560.
- Paredes, E., Costas, D., Casal, A., Cortina-Burgueño, A. & Lubián, L. M. 2013. Criopreservación de microalgas marinas: *Nannochloropsis gaditana* *Rhodomonas lens*, *Cylindrotheca closterium*, *Chaetoceros gracilis*, *Synechococcus* sp. e *Isochrysis aff. galbana* clon T-ISO. V Foro Iberoamericano de los recursos marinos y la Acuicultura 263-272.
- Parke, M. 1949. Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 28 (01): 255-286.
- Parrish, C. C., Michael Whiticar & Velmurugu Puvanendran 2007. Is $\omega 6$ docosapentaenoic acid an essential fatty acid during early ontogeny in marine fauna?. *Limnology and Oceanography*, 52 (1): 476-479.
- Pascher, A. (1910). Chrysomonaden aus dem Hirschberger Grossteiche: Untersuchungen über die Flora des Hirschberger Grossteiches: I. Teil: W. Klinkhardt.
- Patiño, M. 1995. Nutrición de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. con microalgas marinas. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Patterson, G. W., Tsitsa-Tsardis, E., Wikfors, G. H., Gladu, P. K., Chitwood, D. J. & Harrison, D. 1994. Sterols and alkenones of *Isochrysis*. *Phytochemistry*, 35 (5): 1233-1236.
- Ponis, E., Parisi, G., Chini-Zittelli, G., Lavista, F., Robert, R. & Tredici, M. R. 2008. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282 (1-4): 97-103.
- Ponis, E., Robert, R. & Parisi, G. 2003. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 221 (1-4): 491-505.
- Ponis, E., Robert, R., Parisi, G. & Tredici, M. 2003. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. *Aquaculture International*, 11 (1): 69-79.
- Pragya, N., Pandey, K. K. & Sahoo, P. K. 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24 (0): 159-171.

Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V. & Brányik, T. 2013. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology* 1-19.

Provasoli, L. & Carlucci, A. F. (1974). Vitamins and growth regulators. In W. D. P. Stewart (Ed.), *Algal physiology and biochemistry* (pp. 741-787). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Pulz, O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (3): 287-293.

Pulz, O. & Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65 (6): 635-648.

Qiang, H. & Richmond, A. 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoor in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 6 (4): 391-396.

Ranjbar, R., Inoue, R., Shiraishi, H., Katsuda, T. & Katoh, S. 2008. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical engineering journal*, 39 (3): 575-580.

Raposo, Maria Filomena de Jesus, de Moraes, Rui Manuel Santos Costa & Bernardo de Moraes, Alcina Maria Miranda 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine drugs*, 11 (1): 233-252.

Raven, J. A. & Geider, R. J. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytologist*, 110 (4): 441-461.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G. & Olsen, Y. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155 (1-4): 207-221.

Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L., Kuo, C., Padovan, A. & Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 3 (1): 43-53.

Renaud, S. M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G. & Parry, D. L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211 195-214.

Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L. V. & Woo, K. C. 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis sp.*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis sp.* (clone T ISO). *Journal of Applied Phycology*, 7 (6): 595-602.

Richmond, A. 2003. Growth characteristics of ultrahigh-density microalgal cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8 (6): 349-353.

Richmond, A. 1990. Large scale microalgal culture and applications. *Progress in phycological research*, 71-62.

Rodger B. Baird. (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C: American Public Health Association.

Rodolfi, L., Chini-Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M. R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102 (1): 100-112.

Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leakey, R. J. G., Day, J. G., Bell, E. M. & Stanley, M. S. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource technology*, 129 (0): 439-449.

Roopnarain, A., Sym, S. & Gray, V. M. 2014. Effect of nitrogenous resource on growth, biochemical composition and ultrastructure of *Isochrysis galbana* (Isochrysidales, Haptophyta). *Phycological Research*, 63 (1): 43-50.

Rothhaupt, K. 1990. Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnology and Oceanography*, 35 (1): 16-23.

Ruttner-Kolisko, A. (1974). Plankton rotifers: biology and taxonomy: Schweizerbart.

Salim, S., Shi, Z., Vermuë, M. H. & Wijffels, R. H. 2013. Effect of growth phase on harvesting characteristics, autoflocculation and lipid content of *Ettlia texensis* for microalgal biodiesel production. *Bioresource technology*, 138 (0): 214-221.

Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M. H. & Wijffels, R. H. 2011. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23 (5): 849-855.

Salvesen, I., Reitan, K., Skjermo, J. & Øie, G. 2000. Microbial environments in marine larviculture: Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture international*, 8 (4): 275-287.

Sánchez Mirón, A., Cerón Garca, Maria del Carmen, García Camacho, F., Molina Grima, E. & Chisti, Y. 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology*, 31 (7): 1015-1023.

Sánchez Mirón, A., García Camacho, F., Contreras Gómez, A., Grima, E. M. & Chisti, Y. 2000. Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE Journal*, 46 (9): 1872-1887.

Sánchez, S., Martínez, M. & Espinola, F. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical engineering journal*, 6 (1): 13-18.

Sandhya 2010. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT-Food Science and Technology*, 43 (3): 381-392.

Saoudi-Helis, L., Dubacq, J. P., Marty, Y., Samain, J. F. & Gudin, C. 1994. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* CLONE T-ISO. *Journal of Applied Phycology*, 6 (3): 315-322.

Sargent, J. R., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. & Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177 (1): 191-199.

Sargent, J. R., Henderson, R. J. & Tocher, D. R. (1989). The lipids. In J. Halver (Ed.), *Fish Nutrition* (pp. 153-218). London: Academic Press.

Sargent, J. R., McEvoy, L. A. & Bell, J. G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155 (1): 117-127.

Sargent, J. R., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179 (1): 217-229.

Sato, N. & Murata, N. 1988. Membrane lipids. *Methods in enzymology*, 167:251-259.

Sayegh, F. A. Q. & Montagnes, D. J. S. 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource technology*, 102 (3): 3007-3013.

Sayegh, F. A. Q., Radi, N. & Montagnes, D. J. S. 2007. Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotifer *Brachionus plicatilis*?. *Aquaculture*, 273 (4): 665-678.

Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M. & Otero, A. 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 381 (1): 1-9.

Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M. P. & Otero, A. 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283:83-91.

Seychelles, L. H., Audet, C., Tremblay, R., Fournier, R. & Pernet, F. 2009. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Muller) using frozen-concentrated microalgae. *Aquaculture Nutrition*, 15 (4): 431-439.

Shelef, G., Sukenik, A. & Green, M. (1984). *Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review*. Haifa, Israel.

Shuman, T. R., Mason, G., Marsolek, M. D., Lin, Y., Reeve, D. & Schacht, A. 2014. An ultra-low energy method for rapidly pre-concentrating microalgae. *Bioresource technology*, 158 (0): 217-224.

- Sierra, E., Acien Fernández, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C. & Molina-Grima, E. 2008. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138 (1-3): 136-147.
- Sim, T., Goh, A. & Becker, E. W. 1988. Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae. *Biomass*, 16 (1): 51-62.
- Simental, J. A. & Sanchez-Saavedra, M. P. 2003. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering*, 27 (4): 265-272.
- Snell, T. W. 1986. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology*, 92 (2): 157-162.
- Snell, T. W., Dingmann, B. J. & Serra, M. 2001. Density-dependent regulation of natural and laboratory rotifer populations. *Hydrobiologia*, 446/447:39-44.
- Sorokin, C. & Krauss, R. W. 1962. Effects of temperature and illuminance on *Chlorella* growth uncoupled from cell division. *Plant Physiology*, 37 (1): 37.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. & Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, 25 (4): 686-692.
- Sukenik, A. & Wahnou, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97 (1): 61-72.
- Sun, Y. Y., Wang, C. H. & Jing, C. 2008. Growth inhibition of the eight species of microalgae by growth inhibitor from the culture of *Isochrysis galbana* and its isolation and identification. *Journal of Applied Phycology*, 20 (3): 315-321.
- Swift, D. G. & Taylor, W. R. 1974. Growth of vitamin B₁₂-limited cultures: *Thalassiosira pseudonana*, *Monochrysis lutheri*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of phycology*, 10 (4): 385-391.
- Tamburic, B., Zemichael, F. W., Crudge, P., Maitland, G. C. & Hellgardt, K. 2011. Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (11): 6578-6591.
- Teoh, M. L., Chu, W. L., Marchant, H. & Phang, S. M. 2004. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 16:421-430.
- Thompson, P. A., Guo, M. X. & Harrison, P. J. 1992. Effects of Variation in Temperature .1. on the Biochemical-Composition of 8 Species of Marine-Phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28 (4): 481-488.

Thompson, P. A., Guo, M. X., Harrison, P. J. & Whyte, J. N. C. 1992. Effects of Variation in Temperature .2. on the Fatty-Acid Composition of 8 Species of Marine-Phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28 (4): 488-497.

Thompson, P. A., Harrison, P. J. & Parslow, J. S. 1991. Influence of Irradiance on Cell-Volume and Carbon Quota for 10 Species of Marine-Phytoplankton. *Journal of Phycology*, 27 (3): 351-360.

Tran, D., Le, B., Lee, D., Chen, C., Wang, H. & Chang, J. 2013. Microalgae harvesting and subsequent biodiesel conversion. *Bioresource technology*, 140 (0): 179-186.

Tredici, M. R. 2004. Mass production of microalgae: photobioreactors. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 1178-214.

Tzovenis, I., Pauw, N. D. & Sorgeloos, P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture*, 216223-242.

Tzovenis, I., Pauw, N. D. & Sorgeloos, P. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO). *Aquaculture International*, 5489-507.

Ukeles, R. 1961. The effect of temperature on the growth and survival of several marine algal species. *Biological Bulletin*, 120 (2): 255-264.

Utting, S. D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacultural Engineering*, 4 (3): 175-190.

Valenzuela-Espinoza, E., Cruz, F. L. D. La, Millan-Nunez, R. & Nunez-Cebrero, F. 2005. Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31 (1A): 79-89.

Valenzuela-Espinoza, E., Millan-Nunez, R. & Nunez-Cebrero, F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll alpha content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, 25 (4): 207-216.

Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. & Núñez-Cebrero, F. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, 20 (3): 135-147.

Van Bergeijk, S. A., Salas-Leiton, E. & Cañavate, J. P. 2010. Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, 43 (1): 14-23.

Van der Wal, P., Leunissen-Bijvelt, J. & Verkleij, A. J. 1985. Ultrastructure of the membranous layers enveloping the cell of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. *Journal of ultrastructure research*, 91 (1): 24-29.

- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. & Garland, C. D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 128 (3): 219-240.
- Vonshak, A., Cheung, S. M. & Chen, F. 2000. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology*, 36 (4): 675-679.
- Wacker, A., Becher, P. & von Elert, E. 2002. Food quality effects of unsaturated fatty acids on larvae of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Limnology and Oceanography*, 47 (4): 1242-1248.
- Wallace, R. L. 2002. Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and comparative biology*, 42 (3): 660-667.
- Walne, P. R. (1979). Culture of bivalve molluscs: 50 years' experience at Conwy: Fishing News Books Ltd.
- Walne, P. R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*.
- Wang, C. & Lan, C. Q. 2018. Effects of shear stress on microalgae—a review. *Biotechnology Advances*, 36 (4): 986-1002.
- Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34 (1): 115-143.
- Webb, K. L. & Chu, F. E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae, 27272-291.
- Xin, L., Hong-ying, H. & Yu-ping, Z. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource technology*, 102 (3): 3098-3102.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. & Takriff, M. S. 2014. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21 (1): 6.
- Yadala, S. & Cremaschi, S. 2014. Design and optimization of artificial cultivation units for algae production. *Energy (Oxford)*, 7823-39.
- Yang, S. & Hur, S. 2012. Selection of *Isochrysis* and *Pavlova* Species for Mass Culture in High Temperature Season. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45 (4): 343-350.
- Yeoman, K., Fahnert, B., Lea-Smith, D. & Clarke, T. (2020). Microbial Biotechnology: Oxford University Press.

Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C. & Hagiwara, A. 1997. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia*, 358 (1): 139-144.

Yúfera, M. 2001. Studies on *Brachionus* (Rotifera): an example of interaction between fundamental and applied research. *Hydrobiologia*, 446383-392.

Yúfera, M. & Navarro, N. 1995. Population growth dynamics of the rotifer *Brachionus plicatilis* cultured in non-limiting food condition. *Hydrobiologia*, 313 (1): 399-405.

Zhang Fang, Cheng Lihua, Xu Xinhua, Zhang Lin, Chen Huanlin 2012. Technologies of Microalgal Harvesting and Lipid Extraction. *Progress in Chemistry* (10): 2062.

Zhang, C. W. & Richmond, A. 2003. Sustainable, high-yielding outdoor mass cultures of *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* and *Isochrysis galbana* in vertical plate reactors. *Marine Biotechnology*, 5 (3): 302-310.

Zhou, X. R., Robert, S. S., Petrie, J. R., Frampton, D. M. F., Mansour, M. P., Blackburn, S. I., Nichols, P. D., Green, A. G. & Singh, S. P. 2007. Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 68 (6): 785-796.

Zhu, C. J. & Lee, Y. K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9 (2): 189-194.

Zhu, C. J., Lee, Y. K. & Chao, T. M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9451-457.

Zijffers, J. F., Schippers, K. J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J. & Wijffels, R. H. 2010. Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 12 (6): 70



ANEXO



Publicaciones derivadas del trabajo realizado en la presente tesis doctoral

El contenido de los Capítulos 1 y 2 de la presente tesis doctoral se ha reproducido parcialmente en el artículo enviado a la revista *Algal Research* de la editorial Elsevier BV (Netherlands, ISSN 2211-9264), pendiente de publicación, con título:

IMPACT OF CULTURE MEDIA AND TEMPERATURE ON PRODUCTIVITY AND FATTY ACID PROFILE OF SEMICONTINUOUS CULTURES OF *Tisochrysis lutea*

A. Cortina-Burgueño^a, G. Acién^b, A. González^c, M. Ferreira^d, A. Otero^a,

^a Instituto de Acuicultura y Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología. Edificio CIBUS, Campus Vida. Universidade de Santiago de Compostela. 15782. Santiago de Compostela. Spain.

^b Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería, Almería, Spain.

^c Estación Experimental Las Palmerillas, Fundación Cajamar, Almería, Spain.

^d ANFACO-CECOPECA, Departamento de Acuicultura, Ctra. Colegio Universitario, 16, 36310 Vigo, Spain.

Índices de Calidad de la revista *Algal Research* (Elsevier) en julio de 2021

CiteScore (Scopus) 6.9

Impact Factor (Journal Citation Reports) 4.401

Posición relativa en su categoría: Q1 en Agronomy and Crop Science

SJR (2020): 1.04

H-INDEX: 64

Contribución del doctorando al trabajo enviado para su publicación

- Conceptualización
- Investigación y experimentación
- Redacción del manuscrito original